

# **Mutationsanalyse und Charakterisierung von transkriptionellen Targetgenen des Metastasierungs-induzierenden Gens MACC1**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Felicitas Schmid

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Stefan Hecht, PhD

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Achim Leutz

2. PD Dr. Thorsten Cramer

3. Prof. Dr. Ulrike Stein

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2013

Diese Arbeit wurde am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch unter Anleitung von Prof. Dr. Ulrike Stein in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Dr. Peter M. Schlag angefertigt.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG UND ABSTRACT</b>	<b>11</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
1.1 Das kolorektale Karzinom	13
1.1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	13
1.1.2 Risikofaktoren für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms	13
1.1.3 Histologischer Aufbau des Darms	14
1.1.4 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung	15
1.2 Metastasierung des kolorektalen Karzinoms	17
1.2.1 Die TNM-Klassifikation	17
1.2.2 Die Metastasierungskaskade	18
1.3 Der HGF/MET Signaltransduktionsweg	20
1.3.1 Mechanismus des Signalweges	20
1.3.2 MET Aktivierung und Metastasierung	23
1.3.3 MET Mutationen in kolorektalen Tumoren	24
1.4 Metastasierungs-induzierende Gene	24
1.4.1 MACC1 (metastasis associated in colon cancer 1)	24
1.4.1.1 Das MACC1 Gen und Protein	24
1.4.1.2 MACC1 SNPs	25
1.4.1.3 MACC1 reguliert MET transkriptionell	26
1.4.1.4 MACC1 fördert die Metastasierung	27
1.4.2 S100P (S100 calcium binding protein P)	28
1.4.2.1 Das S100P Gen und Protein	28
1.4.2.2 S100P und Metastasierung	29
1.4.3 SPON2 (spondin 2, extracellular matrix protein)	30
1.4.3.1 Das SPON2 Gen und Protein	30
1.4.3.2 SPON2 und Metastasierung	31
1.5 Zielstellung der Arbeit	32



<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>33</b>
2.1 Klonierungen	33
2.2 Zellkultur	34
2.2.1 Zelllinien	34
2.2.2 Transfektion von Plasmiden, shRNA-Plasmiden oder siRNA	35
2.2.3 Generierung von Zellklonen	36
2.3 Mutationsanalyse	36
2.3.1 Patientengewebe	36
2.3.2 Mikrodissektion von kolorektalen Tumoren	37
2.3.3 Extraktion von DNA und RNA aus humanen kolorektalen Tumoren	38
2.3.4 PCRs und Sequenzierung	38
2.3.5 Site-directed mutagenesis	39
2.4. Genexpressionsanalysen	40
2.4.1 RNA Isolierung aus Zelllinien	40
2.4.2 Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren	40
2.4.3 Expressions-Microarrays	40
2.4.4 cDNA Synthese	41
2.4.5 Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)	41
2.4.6 Proteinextraktion	42
2.4.7 Proteinbestimmung	42
2.4.8 Western Blot	43
2.5 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	44
2.6. Funktionale Assays	45
2.6.1 Migrationsassay	45
2.6.2 Invasionsassay	45
2.6.3 Wundheilungsassay	45
2.6.4 Proliferationsassay	45
2.6.5 Koloniebildungsassay	46
2.7 <i>In vivo</i> Metastasierungsstudien	46
2.7.1 Intrasplenale Applikation von Tumorzellen in Xenograft Modelle	46
2.7.2 Biolumineszenz-Messungen und Analyse des Tumors und der Metastasen	47
2.8 Statistik	48

<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
<b>3.1 MACC1 Mutationsanalyse in kolorektalen Tumoren</b>	<b>49</b>
3.1.1 Identifizierte MACC1 SNPs und MET Varianten in kolorektalen Tumoren	49
3.1.2 MACC1 SNPs haben keinen Einfluss auf die MACC1 Expression	51
3.1.3 MACC1 SNPs haben keinen Effekt auf die Zellproliferation	53
3.1.4 MACC1 SNPs beeinflussen nicht die Zellmigration	54
3.1.5 MACC1 SNPs haben keinen Einfluss auf die gerichtete Zellmigration	55
3.1.6 MACC1 SNPs sind nicht mit klinischen Parametern assoziiert	57
3.1.7 MACC1 SNPs sind nicht mit dem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert	59
3.1.8 MACC1 SNPs sind nicht assoziiert mit dem metastasenfrien Überleben der Patienten	60
3.1.9 Jüngere Kolonkarzinompatienten in frühen Stadien mit MACC1 SNP 515 SL haben ein signifikant verkürztes metastasenfries Überleben	62
<b>3.2 Identifizierung von neuen transkriptionellen MACC1 Targetgenen und deren Einfluss auf die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms</b>	<b>63</b>
3.2.1 Identifizierung von transkriptionellen MACC1 Targetgenen mittels Microarray Analyse	63
3.2.2 MACC1 reguliert die S100P und SPON2 Expression in SW480 und SW620 Zellen	66
3.2.3 Endogene S100P und SPON2 Expressionslevels in weiteren kolorektalen Karzinomzelllinien	69
3.2.4 MACC1 bindet an die Promoterregionen von S100P und SPON2	70
3.2.5 Charakterisierung von S100P und SPON2 Zellklone	70
3.2.6 S100P und SPON2 fördern die Zellproliferation	71
3.2.7 S100P und SPON2 aktivieren die Zellmigration	72
3.2.8 S100P und SPON2 begünstigen die gerichtete Zellmigration	73
3.2.9 S100P und SPON2 steigern die Zellinvasion	74
3.2.10 S100P und SPON2 begünstigen die Koloniebildung	75
3.2.11 S100P und SPON2 fördern die Metastasierung <i>in vivo</i>	76
3.2.12 S100P und SPON2 sind in humanen metastasierenden kolorektalen Tumoren höher exprimiert	80
3.2.13 Patienten mit hoher S100P oder SPON2 Expression haben ein kürzeres metastasenfries Überleben	82

<b>4 DISKUSSION</b>	<b>85</b>
<b>4.1 MACC1 Mutationsanalyse</b>	<b>85</b>
4.1.1 MACC1 SNPs in humanen kolorektalen Tumoren	85
4.1.2 MET Varianten in humanen kolorektalen Tumoren	87
4.1.3 Einfluss von MACC1 SNPs in Motilitäts- und Proliferationsstudien	88
4.1.4 Assoziation von MACC1 SNPs mit klinischen Daten und mit dem Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom	88
<b>4.2 Neu identifizierte transkriptionelle MACC1 Targetgene und deren Einfluss auf die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms</b>	<b>89</b>
4.2.1 Mittels genomweiter Analyse identifizierte MACC1 Targetgene	89
4.2.2 Aktivierte biologische Prozesse und Pathways in MACC1 überexprimierenden kolorektalen Karzinomzellen	92
4.2.3 Regulierung von S100P und SPON2 durch MACC1 in kolorektalen Karzinomzellen	93
4.2.4 S100P als Metastasierungs-induzierendes Gen	93
4.2.5 SPON2 als Metastasierungs-induzierendes Gen	95
<b>5 AUSBLICK</b>	<b>98</b>
<b>6 REFERENZEN</b>	<b>99</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>113</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>116</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>117</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ADAMTS	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT/GSK3 $\beta$	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog/glycogen synthase kinase 3 beta
APC	adenomatous polyposis of the colon
AP2	activating protein 2
ASPSCR1	alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1
BMP4	bone morphogenetic protein 4
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CacyBP	calcyclin binding protein
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
Cdc42	cell division cycle 42, GTP binding protein, 25kDa
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CHRAC1	chromatin accessibility complex 1
c-SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog avian
DCC	deleted in colon cancer
DIL1	differentially expressed in cancerous and noncancerous lung cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EIF4E3	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EMT	Epitheliale–Mesenchymale Transition
EPS8L3	EPS8-like 3
ETV1	ets variant 1
EZR	ezrin
FAK	focal adhesion kinase-1
FAM	family with sequence similarity
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FKS	Fötales Kälberserum
FZD10	frizzled family receptor 10
GAB1	GRB2-associated-binding protein 1
GDP	guanosine diphosphate
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
GTF2IRD1	GTF2I repeat domain containing 1
GTP	guanosine triphosphate
GYPC	glycophorin C (Gerbich blood group)
HAI1	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1
HAI2	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 2
HGF	hepatocyte growth factor
HNPCC	hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom oder Lynch Syndrom
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRP	horseradish peroxidase
Il-6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1
JNK/SAPK	c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinase

KIAA	protein phosphatase 1
KLRC	killer cell lectin-like receptor subfamily C
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LB	lysogeny broth
LEF1	lymphoid-enhancing factor 1
LOH	Loss of Heterozygosity
LOX	lysyl oxidase
MACC1	metastasis associated in colon cancer 1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	dual specificity mitogen-activated protein kinase
MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
MMP	matrix metalloproteinase
MSH	mutS homolog E. coli
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog avian
NELF	nasal embryonic LHRH factor
NFκB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NGFR	nerve growth factor receptor
PAGE	P antigen family
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PLC-γ	phospholipase C-gamma
PPAP2C	phosphatidic acid phosphatase type 2C
PSA	prostata-spezifische Antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Rac	ras-related C3 botulinum toxin substrate, rho family, small GTP binding protein Rac
RAD23A	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)
RAGE	receptor for advanced glycation end-products
RHOA	ras homolog gene family, member A
RICTOR	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2
RIN	RNA integrity number
RT	reverse transcription
SAA	serum amyloid A
SCID	severe combined immune deficient
S100P	S100 calcium binding protein P
S100PPBPR	S100P binding protein
SEMA	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin)
SGT1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)
SH	Src Homology
SHC	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
SH3BP4	SH3-domain binding protein 4
shRNA	small hairpin RNA
SIP1	smad-interacting protein-1
siRNA	small interfering RNA
SMAD4	SMAD family member 4

Snail	snail homolog (Drosophila)
SNP	single nucleotide polymorphism
SOS	son of sevenless homolog (Drosophila)
sp1	specificity protein 1
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein
SPRY	sprouty homolog
STAT	signal transducer and activator of transcription
STR	short tandem repeat
SYN3	synapsin III
TFF3	trefoil factor 3 (intestinal)
TGF- $\beta$	transforming growth factor, beta
THR	thyroid hormone receptor
TP53	tumor protein p53
TSR	thrombospondin type I repeats
TR	thyroid hormone receptor
TRE	thyroid hormone response elements
TWIST	twist homolog 1 (Drosophila)
Tyr	Tyrosine
UCKL1	uridine-cytidine kinase 1-like 1
UICC	International Union Against Cancer
UKCCCR	United Kingdom Coordinated Committee on Cancer Research
USH1C	usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe)
UTR	untranslated region
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
Wnt	wingless-type MMTV integration site family

**ZUSAMMENFASSUNG**

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist die zweithäufigste Krebserkrankung und die Metastasierung die häufigste Todesursache hierbei. Das neu identifizierte Gen MACC1 (metastasis associated in colon cancer 1) wurde als prognostischer Marker für die Metastasierung des KRK beschrieben. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Exons 14-19 des Protoonkogens MET (met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)) und die kodierenden Exons von MACC1 in kolorektalen Tumoren sequenziert. Es waren in 60 Tumoren nur zwei MET Mutationen zu finden. In 154 kolorektalen Tumoren wurden die drei MACC1 single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs47211888, rs975263 und rs3735615 identifiziert. Diese MACC1 SNPs veränderten nicht die MACC1 Expression in Tumoren oder KRK-Zelllinien. Sie waren nicht mit klinischen Daten von Patienten, nicht mit dem Gesamtüberleben oder dem metastasenfreien Überleben aller Patienten mit KRK assoziiert. Der MACC1 SNP rs975263 war signifikant mit einem kürzeren metastasenfreien Überleben in einer kleineren Gruppe von jüngeren Kolonkarzinom Patienten in frühen Stadien assoziiert. Zudem wurden mittels Microarray Analyse Targetgene von MACC1 identifiziert. MACC1 regulierte die Expression von S100P (S100 calcium binding protein P) und SPON2 (spondin 2, extracellular matrix protein) in den Zelllinien SW480 und SW620. Eine S100P oder SPON2 Überexpression förderte die Zellproliferation, Zellmigration und Zellinvasion. Intraspinal transplantierte Zellen mit hoher S100P oder SPON2 Expression führten im Gegensatz zu Kontrollzellen in Xenograft Modellen zur Bildung von Metastasen. Des Weiteren war die S100P oder SPON2 Expression in humanen metachron metastasierenden kolorektalen Tumoren höher als in nicht metastasierenden Tumoren. Patienten mit einer hohen S100P oder SPON2 Expression in ihren Tumoren hatten ein kürzeres metastasenfreies Überleben im Vergleich zu Patienten mit niedriger Expression. S100P und SPON2 könnten somit eine wichtige Rolle in der Metastasierung spielen.

Schlagwörter: Kolorektales Karzinom; Metastasierung; MACC1; Mutationsanalyse; Targetgene; S100P; SPON2

**ABSTRACT**

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related deaths in the Western World, mainly due to metastasis. The gene MACC1 (metastasis associated in colon cancer 1) was described as a prognostic marker for CRC metastasis. In this study, we sequenced the exons 14-19 of the protooncogene MET (met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)) and the coding exons of MACC1 in colorectal tumors. We found two MET mutations in 60 tumors. In 154 tumors we identified the MACC1 single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs47211888, rs975263 and rs3735615. These SNPs did neither modify the MACC1 expression in tumors nor in CRC cell lines. They were not associated with clinical parameters of the patients or with the overall survival and metastasis-free survival time of all CRC patients. Only in a subgroup, younger patients with colon cancer in early stages, the SNP rs975263 was significantly associated with a shorter metastasis-free survival time. Additionally, we identified new target genes of MACC1 by microarray analysis. MACC1 regulated the expression of S100P (S100 calcium binding protein P) and SPON2 (spondin 2, extracellular matrix protein) in the cell lines SW480 and SW620. Cell with a high S100P and SPON2 expression, intrasplenically transplanted into NOD/SCID mice, led to metastasis formation whereas transplanted control cells did not metastasize at all. The S100P and SPON2 expression was higher in colorectal tumors with metachronous metastasis than in non-metastasizing tumors. CRC patients with a high S100P or SPON2 expression in their primary tumors had a shorter metastasis-free survival time compared to patients with a low expression. Thus, S100P and SPON2 might play an important role in CRC metastasis.

Keywords: colorectal cancer; metastasis; MACC1; mutation analysis; target genes; S100P; SPON2



## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Das kolorektale Karzinom

#### 1.1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist weltweit die dritthäufigste und in Deutschland die zweithäufigste Krebserkrankung. 2008 wurden in Deutschland mehr als 60.000 neue Fälle diagnostiziert. Im gleichen Jahr starben über 25.000 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Nur ca. 10% der Patienten erkranken vor dem 55. Lebensjahr. Mehr als 6% aller Deutschen entwickeln im Laufe ihres Lebens ein kolorektales Karzinom [1].

Am häufigsten treten kolorektale Karzinome in Industriestaaten, wie z. B. in Australien oder in Ländern in Europa oder Nordamerika, auf. Kolorektale Karzinome werden am seltensten in Afrika oder in Zentralasien diagnostiziert. Die Häufigkeit des Auftretens von kolorektalen Karzinomen steigt in einigen osteuropäischen und ostasiatischen Ländern seit den 80iger Jahren stetig an. Dies ist vor allem auf veränderte Lebensweisen, wie z. B. fettreiche Ernährung und Rauchen, zurückzuführen. In wenigen westlichen Ländern sind Neuerkrankungen aufgrund von umfangreichen Vorsorgeprogrammen, wie etwa die frühzeitige Vorsorge-Koloskopie, rückläufig [2, 3]. Die altersstandardisierte Sterberate ist auch in Deutschland um mehr als 20% zurückgegangen, was auf eine immer bessere Therapiemöglichkeit zurückzuführen ist [1].

#### 1.1.2 Risikofaktoren für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms

Studien zeigten, dass eine familiäre Vererbung in etwa 20 bis 30% der Fälle zum Auftreten des kolorektalen Karzinoms beiträgt. In 5 bis 10% ist eine der beiden gut charakterisierten hereditären Formen, das FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) und das HNPCC (hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom, auch Lynch Syndrom genannt), verantwortlich für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms [2]. FAP ist im Wesentlichen bedingt durch eine Keimbahnmutation des APC Gens (Adenomatous Polyposis of the Colon). Patienten mit HNPCC weisen Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Keimbahnmutationen in der Familie der MSH (mutS homolog E. coli) DNA-Mismatch-Reparaturgene auf [3]. Weiterhin tragen auch Patienten mit einer chronischen Darmerkrankung, wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, ein erhöhtes Risiko [4].

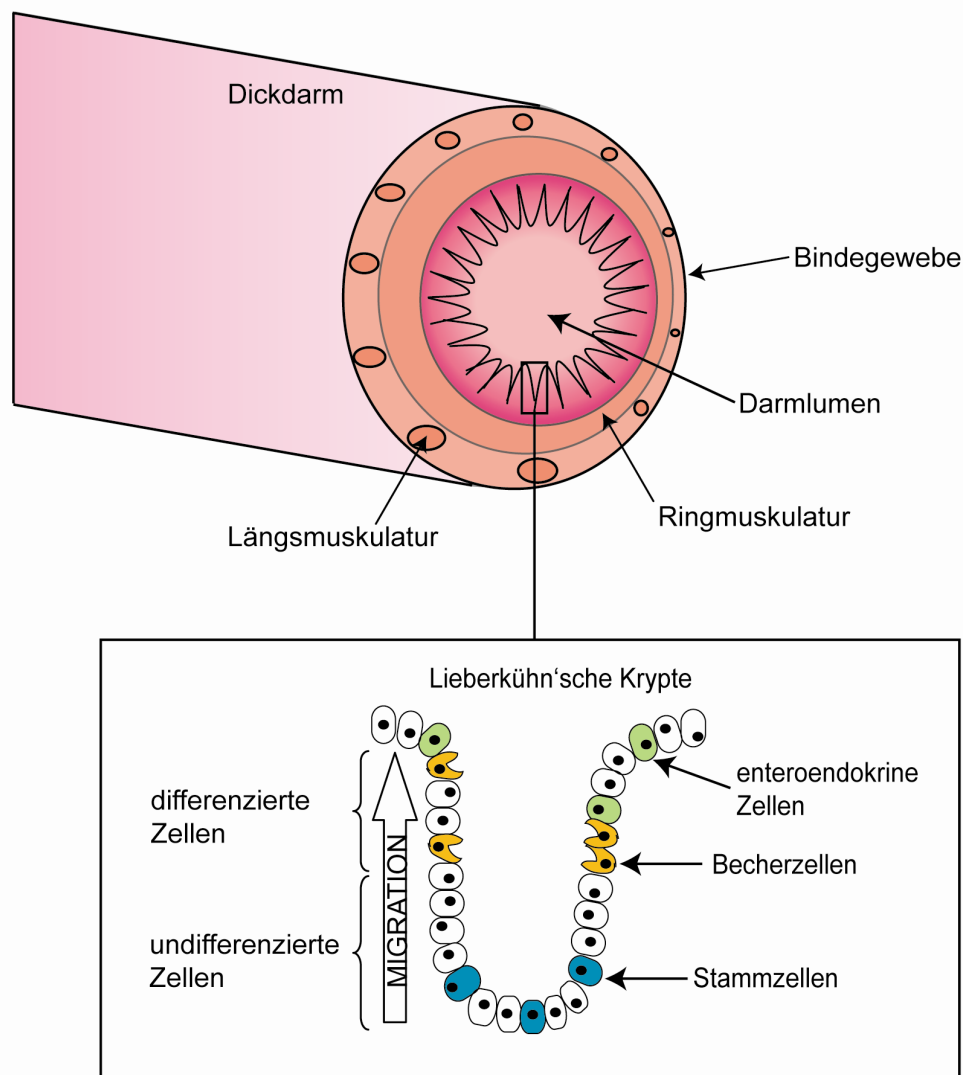
Der Großteil aller kolorektalen Tumore entsteht allerdings sporadisch und die genetischen Faktoren, die dafür ausschlaggebend sind, sind vielfältig.

Einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von kolorektalen Karzinomen spielt das Alter der Patienten. Über 90% der kolorektalen Karzinome treten nach dem 50. Lebensjahr auf. Deshalb wird ab dem 50. Lebensjahr die jährliche Vorsorgeuntersuchung empfohlen [5]. Männer sind etwas häufiger von der Entstehung des kolorektalen Karzinoms betroffen als Frauen [6]. Andere durch Umwelteinflüsse bekannte Risikofaktoren, die zum Auftreten von kolorektalen Karzinomen führen können, sind u. a. Rauchen, Bewegungsmangel, Übergewicht oder Fettleibigkeit und der übermäßige Konsum von (rotem) Fleisch und Alkohol [7-9]. Die Heilungschancen hängen stark davon ab, in welchem Stadium das Karzinom bemerkt wird. Im Durchschnitt überleben 50 bis 65% der Patienten die ersten fünf Jahre nach Diagnose.

### 1.1.3 Histologischer Aufbau des Darms

Das kolorektale Karzinom bezeichnet einen malignen Tumor im Darm. 90% aller diagnostizierten Tumore sind Adenokarzinome, die überwiegend im Dickdarm vorkommen. Der Dickdarm (*Intestinum crassum*) gliedert sich in das *Caecum* (Blinddarm), das *Colon* (Grimmdarm) und das *Rectum* (Mastdarm) [10].

Die Darmwand besteht aus einer äußeren Längs- und einer inneren Ringmuskulatur (Abb. 1.1). Histologisch gesehen finden sich im Kolon keine Zotten mehr. Hier liegen ausgestreckte und gut ausgebildete Krypten vor, die Lieberkühn'schen Krypten (Ausschnitt Abb. 1.1). In der Tiefe dieser Krypten befinden sich überwiegend stark proliferierende und noch vorwiegend undifferenzierte multipotente Stammzellen, die für die Regeneration wichtig sind. Die Zellen in der Tiefe der Krypte migrieren zum Darmlumen hin und differenzieren sich aus [11]. Eine ausdifferenzierte Zelle hat nur eine durchschnittliche Lebenszeit von etwa drei Tagen. In der oberen Zone sitzen u. a. die Becherzellen (oder auch Goblet-Zellen genannt), die Schleim produzieren und sekretieren. Die Anzahl der Becherzellen nimmt in Richtung Rektum stetig zu, was zu einer gesteigerten Schleimbildung und einem gleichzeitigen Wasserentzug des Chymus führt. Ebenfalls in der oberen Zone befinden sich die hormonbildenden enteroendokrinen Zellen. Sie bestehen aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen, die aber alle zur Regulation der Verdauungstätigkeit beitragen [10].



**Abb. 1.1 Struktur des Dickdarms mit Lieberkühn'schen Krypten.**

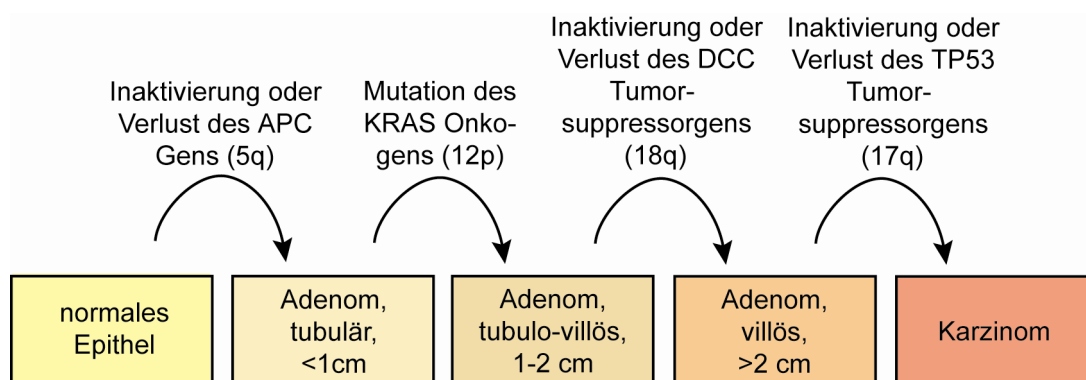
Die Abbildung stellt schematisch den Aufbau des Dickdarms dar. Im Vergleich zum Dünndarm befinden sich hier kaum Zotten, dafür aber viele gut ausgebildete bis tief ins Innere reichende Lieberkühn'sche Krypten (vergrößerter Ausschnitt). In der Zone der proliferierenden, undifferenzierten Zellen sitzen vor allem die Stammzellen. Diese migrieren in Richtung Darm-lumen und differenzieren dort aus. Am epithelialen Rand sitzen die hormonbildenden enteroendokrinen Zellen und die schleimbildenden Becherzellen.

#### 1.1.4 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung

Die Vorstufe der Karzinome sind meist adenomatöse Polypen. Für die Entstehung von Adenomen liegen zwei Theorien vor: die Top-down und die Bottom-up Hypothese [12]. Die Top-down Theorie legt zugrunde, dass Stammzellen in der Lieberkühn'schen Krypte APC Mutationen entwickeln. Die mutierten Zellen proliferieren stark und gelangen schließlich in die obere Zone der Krypte, wo sie weiterhin expandieren und das Adenom bilden [13]. Die Bottom-up Hypothese besagt, dass Zellen in der oberen

ausdifferenzierten Zone mutieren, transformieren, sich zur Seite und vor allem in die Krypte ausbreiten können. Sie können u. a. auch die gesamte Krypte ausfüllen und somit ein Adenom bilden [14].

Tumore entstehen durch die Aktivierung von Onkogenen (wie z. B. KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog avian) und durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, z. B. TP53 (tumor protein p53) oder APC. Die Aktivierung von Onkogenen wird durch aktivierende Mutationen ausgelöst. Zudem wurde für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen gezeigt, dass Mutationen in mindestens vier bis sieben Genen zur Entwicklung eines malignen Tumors beitragen. Die Häufung solcher genetischen Alterationen bestimmt die Transformation von normalem Epithel zum Adenom und anschließend zum Karzinom [15-17]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass epigenetische Veränderungen, so wie z. B. die Hyper- oder Hypo-Methylierung von Genen, bei der Transformation eine wichtige Rolle spielen [18]. Zudem tragen ca. 15% der kolorektalen Karzinome MSI, die durch inaktivierte DNA-Mismatch-Reparaturgene hervorgerufen werden [19].



**Abb. 1.2 Schematische Abbildung der Adenom-Karzinom Theorie.**

Die Adenom-Karzinom Theorie besagt, dass ein mehrstufiger Prozess zur Entstehung der Karzinome führt. In einer ersten Stufe mutiert das auf Chromosom 5q lokalisierte APC (Adenomatous Polyposis of the Colon) Gen. Es entstehen kleine tubuläre Adenome, die durch Mutationen des KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) Onkogens in größere tubulo-villöse Adenome transformieren können. Treten in diesen nun Mutationen oder Verluste des DCC (deleted in colon cancer) Tumorsuppressorgens auf, entwickeln sich villöse Adenome, die durch Verluste des TP53 (tumor protein p53) Gens zu einem Karzinom führen können.

Die Adenom-Karzinom Theorie (Abb. 1.2) besagt, dass bestimmte Mutationen in einem mehrstufigen Prozess zu einem definierten Zeitpunkt auftreten und dabei letztendlich zu einem Karzinom führen [20]. In der ersten Phase treten häufig Mutationen des APC Gens auf. Diese führen zur Transformation von normalem Epithel in kleine Adenome.

APC ist ein wichtiges Molekül im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway. Mutationen im APC Gen unterbinden die Phosphorylierung und somit auch die Degradierung von  $\beta$ -Catenin. In der Zelle häuft sich vermehrt  $\beta$ -Catenin an, welches zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathways und zur unkontrollierten Proliferation führt [21]. In einem zweiten Schritt erfolgen vielfach aktivierende Mutationen des Onkogens KRAS. Diese sind in 30 bis 40% aller transformierender Adenome zu finden [22]. Weitergehend treten Mutationen oder Verluste des Tumorsuppressorgens DCC (deleted in colon cancer), von SMAD4 (SMAD family member 4) und des TGF- $\beta$  (transforming growth factor, beta) Rezeptors auf. Der mutierte TGF- $\beta$  Rezeptor II kommt vor allem in Tumoren mit MSI vor und fördert die Proliferation und Invasion der Zellen [23]. In der späten Phase der Karzinomentwicklung mutiert das Tumorsuppressorgens TP53, was letztendlich zur Entstehung des Karzinoms führt (Abb. 1.2). Entsprechend einer Studie von Jones et al. soll die Entwicklung von einem gutartigen Adenom zu einem malignen Karzinom ca. 17 Jahre betragen. Laut einer Studie von Jones et al. können Karzinomzellen innerhalb kürzester Zeit fähig sein Metastasen zu bilden [24].

## 1.2 Metastasierung des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom kann in die Lymphknoten oder in distante Organe metastasieren, wodurch sich die Überlebenszeit der Patienten stark reduziert. Ca. 90% der Patienten mit einem Primärtumor im Stadium I überleben die nachfolgenden fünf Jahre nach Diagnose. Jedoch liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit Fernmetastasen bei nur ca. 10%. Etwa ein Viertel aller Patienten mit kolorektalem Karzinom hat zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen entwickelt. Disseminierte kolorektale Karzinomzellen befallen die Lymphknoten oder zu etwa 70% die Leber, gefolgt von ca. 20% für die Lunge [25].

### 1.2.1 Die TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation wurde gemeinsam von der International Union Against Cancer (UICC) und dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) zur Stadieneinteilung bei Krebserkrankungen etabliert [26]. Die TNM-Klassifikation richtet sich nach der Infiltrationstiefe des Primärtumors (T) und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N) und distanten Metastasen (M). Patienten im UICC-Stadium I haben eine Tumordinfiltration in die *Submucosa* (T1) oder in die *Muscularis propria* (T2), keine regionalen Lymphknotenmetastasen (N0) und auch keine

Fernmetastasen (M0). Im UICC-Stadium II besitzen Patienten einen Primärtumor mit einer Tumordinfiltration von der *Muscularis propria* in die *Subserosa* (T3) oder eine Tumordinfiltration in benachbarte Organe (T4) und haben weiterhin noch keine Metastasen (N0 und M0) entwickelt. Im Stadium III können die Patienten eine beliebige Tumordinfiltrationstiefe (T1-T4) aufweisen; sie haben bereits Lymphknotenmetastasen entwickelt, ein bis drei (N1) oder mehr als vier Lymphknotenmetastasen (N2), aber noch keine Fernmetastasen (M0). Und letztendlich verfügen Patienten im Stadium IV, unabhängig vom Primär- und Lymphknotenstatus (T1-T4, N0-N2), über Fernmetastasen (M1). Das Überleben der Patienten korreliert stark mit dem Stadium. So liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium I bei ca. 90%. Schon im Stadium II überleben etwa 70% bzw. im Stadium III 40% der Patienten die ersten fünf Jahre nach Diagnose. Schließlich liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate im Stadium IV bei nur noch 10% [25].

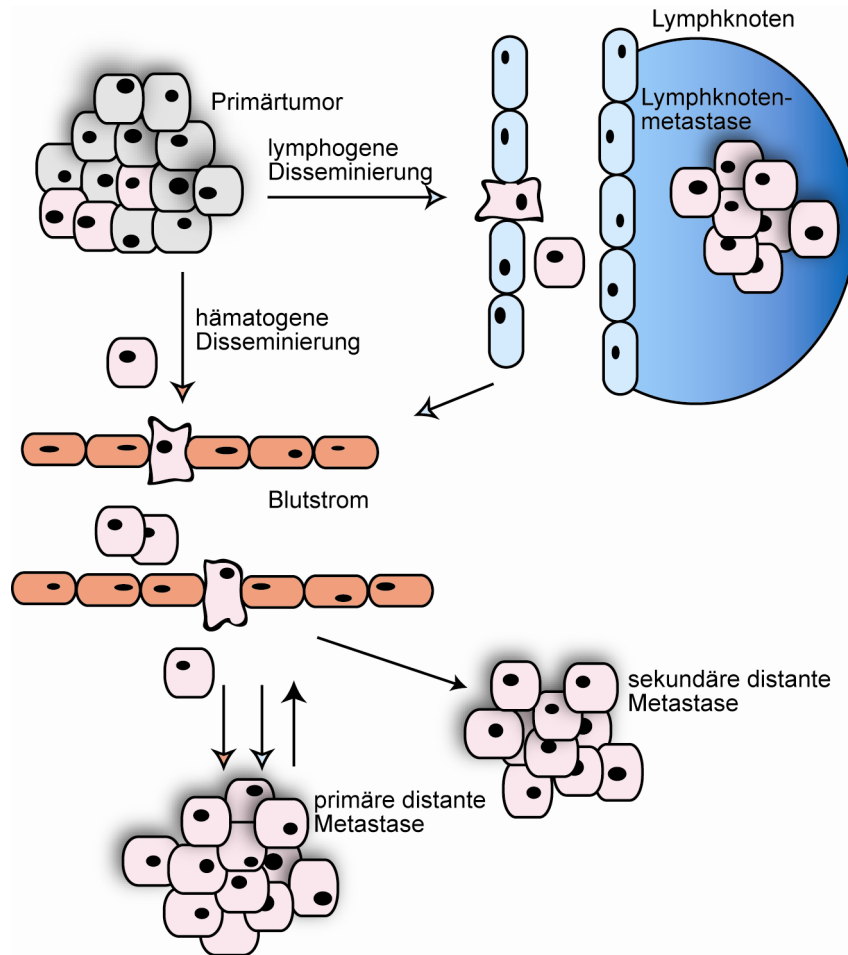
### 1.2.2 Die Metastasierungskaskade

Die Metastasierung ist bedingt durch die Loslösung von Tumorzellen vom Primärtumor und die Ansiedlung und Proliferation dieser in den Zielorganen. Die Disseminierung der Tumorzellen kann präoperativ oder zum Zeitpunkt der Resektion des Tumors erfolgen. Zellen können dabei über den lymphatischen oder den hämatogenen Weg zu distanten Organen gelangen (Abb. 1.3).

Erreichen die Tumorzellen zunächst die Lymphknoten, können sie dort heranwachsen, später von dort zu anderen Organen wandern und Fernmetastasen bilden. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass bei Patienten distante Metastasen, aber keine Lymphknotenmetastasen, auftreten. Tumorzellen können deshalb auch direkt über den Blutstrom zu distanten Organen metastasieren und dort zu primären Metastasen heranwachsen [27].

Zudem wurde postuliert, dass disseminierte Tumorzellen auch das Knochenmark erreichen und sich dort über Jahre hinweg aufhalten können („Dormancy“). Diese können vom Knochenmark aber auch wieder in den Blutstrom gelangen, zirkulieren, und Metastasen bilden. Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patienten korrelieren mit einer schlechten Prognose für den Patienten [28]. Der Prozess der Metastasierung läuft schrittweise ab und kann in unterschiedliche Stufen eingeteilt werden. Zunächst erfolgt die Intravasationsphase, in der sich einzelne Tumorzellen vom Primärtumor lösen, die Gefäßwände invadieren und in den Blutstrom oder in das Lymphsystem gelangen. Eine verringerte Zelladhäsion und die Disseminierung der

Zellen aus dem Zellverband kann durch den Verlust von Cadherinen, Integrinen oder CD44 Molekülen hervorgerufen werden.



**Abb. 1.3 Die lymphogene und hämatogene Metastasierungskaskade.**

Tumorzellen können sich vom Primärtumor lösen und über den lymphatischen Weg in die Lymphknoten oder über den hämatogenen Weg in den Blutstrom gelangen. Befinden sich disseminierte Tumorzellen im Blutstrom, können sie die Gefäßwände durchdringen, in distanten Organen gelangen und dort zu primären Metastasen heranwachsen. Von dort aus können Tumorzellen wiederum in den Blutkreislauf eindringen, auch wieder austreten und sekundäre Metastasen bilden. Sind Lymphknotenmetastasen vorhanden, können sich aus diesen Metastasen Tumorzellen lösen, in den Blutkreislauf invadieren, zu distanten Organen gelangen und dort zu primären Metastasen reifen. Abbildung modifiziert nach Pantel et al. [27].

In der Extravasationsphase durchdringen die disseminierten Tumorzellen die Gefäßwände der Zielorgane und bilden dort Mikrometastasen, die zu gut ausgebildeten Metastasen heranwachsen können. Ein wichtiger Regulator der Zellinvasion sind u. a. die MMPs (Matrix metalloproteinases) und deren Inhibitoren [29].

Entsprechend der „Seed and Soil“ Theorie können Tumorzellen nur in die Zielorgane invadieren, dort proliferieren und Metastasen bilden, in denen für sie günstige

Bedingungen herrschen [30]. Insgesamt besitzen nur ca. 1% aller zirkulierenden Zellen die Fähigkeit Metastasen zu bilden, weshalb man von einem ineffizienten Prozess spricht.

Molekularbiologische Prozesse steuern bei der Entstehung maligner Tumore die Konvertierung der Tumorzellen vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp. Dieses Phänomen wird als epitheliale–mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Die EMT wurde zunächst in der Embryogenese beobachtet [31] und erklärt auch die Konvertierung von frühen Tumorstadien zu invasiven malignen Tumoren [32]. Zellen verlieren ihre Eigenschaft adhären und gerichtete Kontakte zu bilden, verändern ihr Zytoskelett und werden somit zu invasiven Karzinomzellen. Ein früher und bedeutender Prozess, der zu diesen Veränderungen führt, ist der schon beschriebene Verlust von Cadherinen, wie z. B. von E-Cadherin. Die Expression von E-Cadherin führt zur Bildung von stabilen Zell-Zell-Kontakten, von adhären Junctions und fördert die Entwicklung von Desmosomen [33, 34]. Im Verlauf der EMT wird E-Cadherin durch epigenetische Modifikationen, wie z. B. Promoter-Hypermethylierung oder Repression der Transkription, unterdrückt [35]. Gelegentlich treten E-Cadherin Mutationen auf, die zu einem nichtfunktionalen E-Cadherin Protein führen [36]. Weiterhin sind viele Gene entschlüsselt worden, die als Repressoren von E-Cadherin wirken. Dabei wurden die Transkriptionsfaktoren Snail (snail homolog Drosophila) [37], SIP1 (Smad-interacting protein-1) [38] und TWIST (twist homolog 1 Drosophila) [39] entdeckt. Die Expression von Snail wird durch den Scatter Factor HGF (hepatocyte growth factor) induziert [40].

### 1.3 Der HGF/MET Signaltransduktionsweg

Der HGF/MET Signalweg ist in einer Vielzahl an unterschiedlichen Geweben in der Entwicklung, Homöostase und Regeneration involviert. Außerdem ist er in vielen Krebsarten dereguliert und fördert darüber hinaus die Metastasierung. Momentan sind viele Inhibitoren in klinische Studien, die spezifisch HGF, MET (met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)) oder nachgeschaltete Signalproteine hemmen [41].

#### 1.3.1 Mechanismus des Signalweges

HGF ist der Ligand der Rezeptortyrosinkinase MET und stimuliert deren Aktivität [42, 43]. HGF wird zunächst als Prä-Pro-Polypeptid transkribiert und anschließend in ein reifes Protein mit einer schweren  $\alpha$ - und einer leichten  $\beta$ -Kette gespalten. Nur das reife HGF Protein ist fähig den MET Rezeptor zu aktivieren [44].

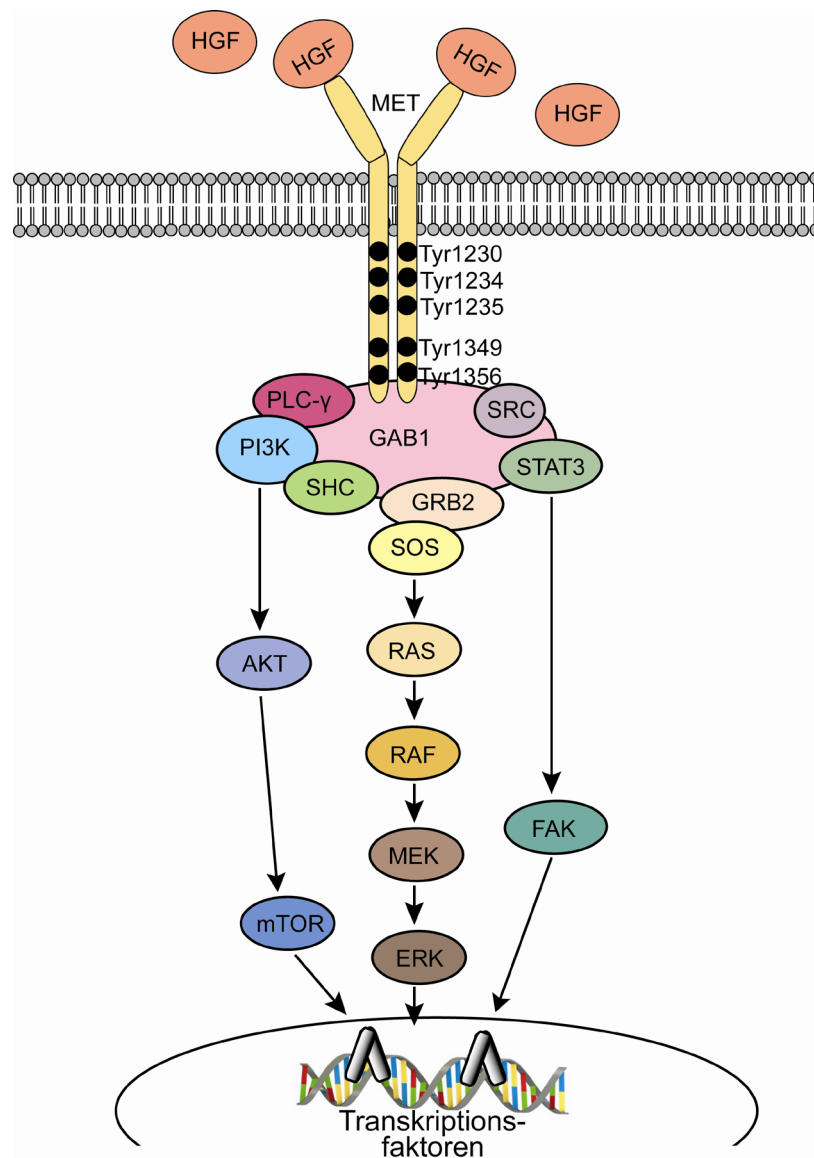


Auch der MET Rezeptor wird posttranskriptionell in eine  $\alpha$ -Kette, die nur extrazellulär lokalisiert ist, und in eine  $\beta$ -Kette gespalten, die aus einem kleinen extrazellulären, einem transmembranen und einen zytoplasmatischen Anteil besteht [45]. Im zytoplasmatischen Teil liegt die Kinase Domäne, die wichtige Aufgaben in der Phosphorylierung des Rezeptors hat [46]. HGF bindet an den extrazellulären Bereich, die Sema Domäne, und ermöglicht somit die Dimerisierung des Rezeptors [47].

Wenn HGF an den Rezeptor bindet, werden die Tyrosine Tyr1230, Tyr1234 und Tyr1235 in der Kinase Domäne des Rezeptors phosphoryliert [48]. Dies aktiviert die Phosphorylierung der Tyrosine Tyr1349 und Tyr1356 in der multidocking site [49]. Substrate, wie z. B. GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2), GAB1 (GRB2-associated-binding protein 1), PLC- $\gamma$  (phospholipase C-gamma), PI3K (the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), SHC (SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1) oder c-SRC (v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog avian) binden an die phosphorylierte Position und werden ebenfalls phosphoryliert [50, 51]. Die Aktivierung von MET und den nachgeschalteten Substraten führt zu einer Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden (Abb. 1.4). Die Signalwege des MAPK [48], des PI3K [52, 53], des JNK/SAPK [54], des FAK [55] und des STAT Pathways [56] sind wichtig für viele zelluläre Prozesse einschließlich der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation dem Zelltod und der Zellmigration.

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, der durch den HGF/MET Pathway aktiviert wird, ist der MAPK Pathway [57]. Proteine wie GRB2 binden mit ihrer SH2 (Src Homology 2) Domäne an die phosphorylierten Aminosäuren des MET Rezeptors. Weiterhin bindet GRB2 mit der SH3 (SRC Homology 3) Domäne an das SOS Protein (Son of Sevenless homolog Drosophila). SOS wird phosphoryliert und bewirkt den Austausch von GDP (guanosine diphosphate) zu GTP (guanosine triphosphate) von einem Protein aus der RAS Familie, welches wiederum phosphoryliert wird. Meistens handelt sich hierbei um HRAS (v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) oder KRAS. In 30 bis 40% aller kolorektalen Tumore ist KRAS mutiert, was häufig zu einer konstitutiven Aktivierung führt [58]. KRAS aktiviert ein Mitglied aus der RAF Familie und löst die Phosphorylierung der MEK (dual specificity mitogen-activated protein kinase) Serin/Threonin/Tyrosin-Kinasen aus. Diese aktivieren wiederum verschiedene MAP Kinasen (mitogen-activated protein kinase) [59].

Der MAPK Pathway spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Migration und ist in ca. ein Drittel aller Krebserkrankungen dereguliert [60].



**Abb. 1.4 Der HGF/MET Pathway.**

Der HGF/MET Pathway wird durch die Bindung von HGF an den MET Rezeptor aktiviert. Dabei werden die Tyrosine (Tyr) in der Kinase Domäne des MET Rezeptor phosphoryliert. Viele Substrate, wie z. B. GAB1 (GRB2-associated-binding protein 1) und GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2), binden daran und aktivieren zahlreiche downstream liegende Signalwege, wie den PI3K/AKT Pathway, den MAPK Pathway oder den STAT3/FAK Pathway. Zuletzt werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Genexpression von Zielgenen regulieren. Die Pathways haben wichtige Aufgaben im Überleben, der Proliferation und Migration von Zellen. AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog), ERK (mitogen-activated protein kinase), FAK (focal adhesion kinase), HGF (hepatocyte growth factor), MEK (dual specificity mitogen-activated protein kinase), MET (met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)), mTOR (mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)), PI3K (phosphoinositide-3-kinase), PLC-γ (phospholipase C-gamma), RAF (v-raf murine leukemia viral oncogene homolog), RAS (rat sarcoma viral oncogene homolog), SHC (SHC (Src homology 2 domain containing)), SOS (Son of Sevenless homolog (Drosophila)), SRC (v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3).

Der HGF/MET Pathway ist nicht nur in der EMT von Bedeutung, sondern auch in der Embryogenese [61], der Organregeneration von Leber, Muskeln und Plazenta [62] und der Wundheilung [63]. Homozygote Knockout Mäuse, die kein HGF oder MET exprimieren, sind embryonal lethal [64, 65]. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass eine hohe MET Expression zu einer gesteigerten Zellproliferation und Zellmotilität führt [66]. Zudem weisen Mäuse mit einer konstitutiven MET Expression einen metastatischen Phänotyp auf [67]. MET spielt deshalb eine zentrale Rolle in der Metastasierung.

### 1.3.2 MET Aktivierung und Metastasierung

MET wird durch den Liganden HGF aktiviert. Die natürlichen HGF Inhibitoren HAI1 (serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1) und HAI2 (serine peptidase inhibitor, Kunitz type 2) hemmen das Protein, welches HGF in seine aktive Form spaltet. Eine niedrige Expression von diesen HGF Inhibitoren führt zu einem erhöhten HGF Level und damit auch zu einer verstärkten Aktivierung des MET Rezeptors [68, 69].

Weiterhin spielen Hypoxie und Angiogenese eine wichtige Rolle im Tumorwachstum. In einem sich ausbreitenden Tumor entstehen hypoxische Bereiche, die durch eine verstärkte Angiogenese zu einem erhöhten O<sub>2</sub>-Influx und einer damit verbundenen geringeren Hypoxie in diesem Gewebe führen kann [70]. Hypoxie aktiviert die Transkription von MET und macht die Zellen sensitiver auf HGF Stimulierung. In hypoxischen Tumorbereichen wird verstärkt MET gebildet, was zur Invasion der Zellen führt [71]. Zudem stimuliert HGF die Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) und des VEGF Rezeptors und fördert die Angiogenese [72].

Ebenso reguliert die MicroRNA-1 die MET Expression, in dem sie an die 3'UTR der MET mRNA bindet und den Abbau der mRNA bewirkt [73]. Weiterhin wird die MET Expression durch den Wnt/β-Catenin Pathway reguliert [74]. Die transkriptionelle Aktivierung von LEF1 (Lymphoid-enhancing factor 1) führt zu einem Crosstalk zwischen dem HGF/MET und dem Wnt/β-Catenin Pathway [75].

Di Renzo et al. zeigten, dass MET in 50% aller kolorektalen Tumoren im Vergleich zur normalen Darmmukosa 2- bis 50-fach überexprimiert ist. Verantwortlich hierfür sind auch genetische Faktoren, wie Amplifikationen des MET Gens oder chromosomale Rearrangements. Diese finden jedoch häufig in der späten Phase der Tumorprogression statt und fördern ebenfalls das metastatische Potenzial der Zellen [76, 77]. Auch Lebermetastasen weisen vielfach eine hohe MET Expression auf [76]. Vor allem können Punktmutationen in der Aktivierungsseite der MET Kinase Domäne zu einer dauerhaften MET Aktivierung führen [78].

### 1.3.3 MET Mutationen in kolorektalen Tumoren

Die ersten Punktmutationen wurden in renalen Tumoren entdeckt [79]. Im Laufe der letzten Jahre wurden viele weitere MET Mutationen identifiziert, von denen sich die meisten in der Sema Domäne, der Juxtamembran und der Kinase Domäne befinden [80].

In kolorektalen Tumoren wurden bisher selten MET Mutationen entdeckt. Die MET Varianten R970C und T992I kommen in einer Studie mit 109 kolorektalen Tumoren nur in einem Tumor (1%) bzw. in keinem der Tumore (0%) vor [81]. Keine der Varianten wurde bisher in Proben gesunder Probanden gefunden [81]. Schmidt et al. beschrieben, dass die MET Variante T992I in renalen Tumoren selten vorkommt und dazu führt, dass der MET Rezeptor in NIH3T3 Zellen nicht mehr phosphoryliert wird [82]. Lee und Kollegen berichteten, dass der Polymorphismus in *in vitro* Assays zwar keinen funktionalen Einfluss hat, aber dass Tumore mit dieser MET Variante in Nacktmäusen geringfügig schneller wachsen [83]. Tyner und Kollegen haben gezeigt, dass die MET Variationen R970C und T992I keinen Einfluss auf die Phosphorylierung und die transformierenden Eigenschaften des Rezeptors haben [81].

### 1.4 Metastasierungs-induzierende Gene

Neu identifizierte Metastasierungs-induzierende Gene können als Biomarker dienen um bereits zu einem frühen Zeitpunkt bestimmen zu können, ob ein Patient Metastasen entwickeln wird. Des Weiteren können auch Inhibitoren gegen Metastasierungs-induzierende Gene gefunden werden, die die Metastasierung verzögern oder hemmen können.

#### 1.4.1 MACC1 (metastasis associated in colon cancer 1)

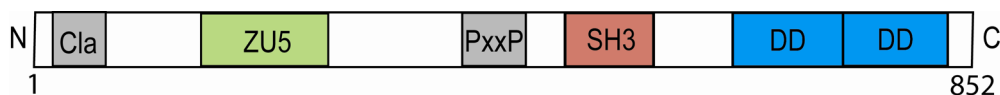
##### 1.4.1.1 Das MACC1 Gen und Protein

Das MACC1 Gen wurde von Stein et al. mittels differentieller RT-PCR von Darmmukosa, Primärtumor und Metastasen Proben von Patienten mit kolorektalem Karzinom entdeckt.

Das humane Gen MACC1 liegt auf dem Chromosom 7 am Locus 7p21.1 auf dem minus Strang des Chromosoms. Bei Magenkarzinomen und intestinalen Karzinomen ist Chromosom 7p vielfach amplifiziert [84]. Das Gen MACC1 hat sieben Exons, wobei nur die Exons vier bis sieben kodierend sind.

Das MACC1 Protein besteht aus 852 Aminosäuren. Bisher wurden durch *in silico*

Analysen verschiedene putative Domänen entschlüsselt (Abb. 1.5). Am N-Terminus befindet sich eine Clathrin Box, gefolgt von einer ZU5 Domäne. C-terminal liegen zwei Death Domänen, die auf eine mögliche Rolle von MACC1 in der Apoptose deuten könnten [85]. Außerdem wurde für die Aminosäuresequenz 552 bis 618 eine SH3 Domäne vorausgesagt. Ist die SH3 Domäne im MACC1 Protein nicht vorhanden, ist das Protein nicht mehr funktional. Zellen mit fehlender MACC1 SH3 Domäne weisen nur noch eine geringfügige Fähigkeit zur Zellproliferation und Zellmigration auf [86].



**Abb. 1.5 Putative Domänen im MACC1 Protein.**

In der N-terminalen Region des Protein befindet sich eine putative Clathrin Domäne (Cla), gefolgt von einer ZU5 Domäne (ZU5). Außerdem liegen für die Signaltransduktion wichtige prolinreiche Sequenzen (PXXP-Motiv) und eine SRC Homology 3 (SH3) Domäne vor. C-terminal sind zwei Death Domänen (DD) lokalisiert. Abbildung modifiziert nach Stein et al. [84].

Zudem ist eine putative prolinreiche Domäne vor der SH3 Domäne gelegen. Werden dort einzelne Nukleotide ausgetauscht, verliert das Protein wiederum seine Funktionalität [86]. Beide Bereiche, die SH3 Domäne und die prolinreiche Domäne, deuten auf eine Rolle von MACC1 in der Signaltransduktion hin. Weiterhin sind mögliche konservierte Phosphorylierungsstellen (Tyrosine: Y379, Y598, Y695, Y768, Y789 und Y793) in der Proteinstruktur zu finden.

Analysiert man die Aminosäuresequenz von MACC1 findet sich eine 40%ige Homologie zum SH3BP4 (SH3-domain binding protein 4) Protein. Diese Homologie ist in der Entwicklung der Wirbeltieren hochkonserviert [84].

#### 1.4.1.2 MACC1 single nucleotide polymorphisms (SNPs)

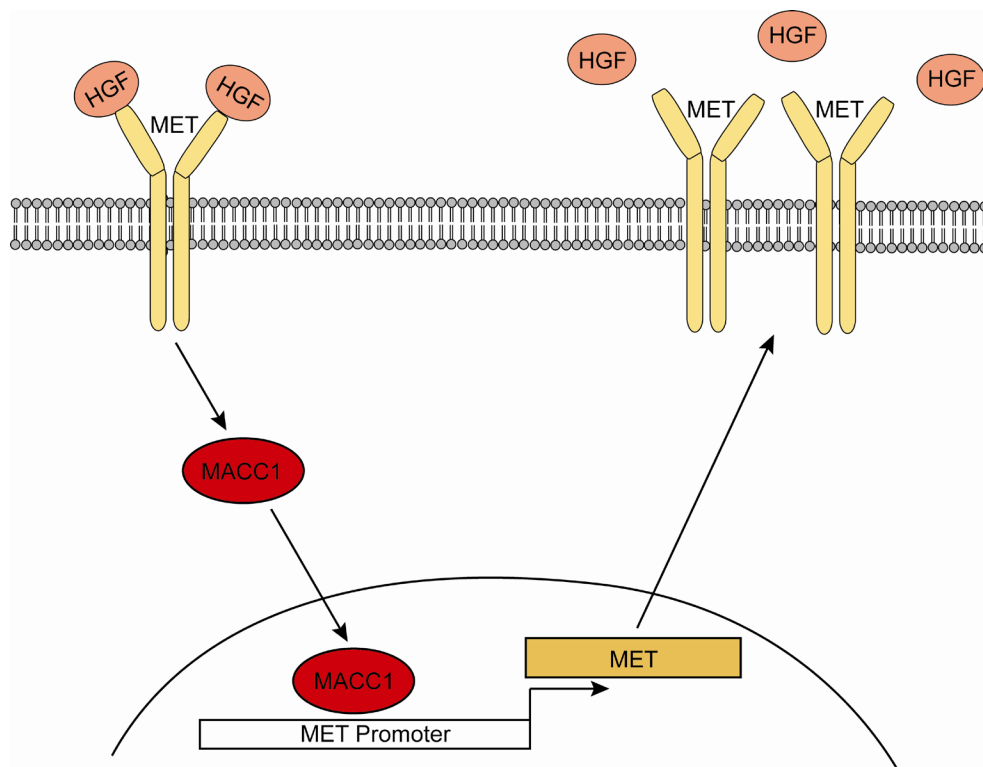
In Datenbanken sind zahlreiche MACC1 SNPs aufgelistet [87]. Allein in der kodierenden Sequenz befinden sich 77 SNPs. Davon sind 55 missense SNPs an deren Stelle ein Nukleotidaustausch stattfindet, der zu einer veränderten Aminosäuresequenz führt.

Ali et al. haben u. a. den MACC1 Locus in Patienten mit einer angeborenen Hörbehinderung sequenziert und dabei keine Mutationen im MACC1 Promoter oder in den MACC1 Exons gefunden [88]. Lang und Kollegen analysierten die MACC1 Introns in kolorektalen Tumoren und untersuchten sechs SNPs (rs1990172, rs3114446, rs10275612, rs3095007, rs3095009 und rs7780032) in Bezug auf das Überleben der

Patienten. MACC1 SNP rs1990172 ist assoziiert mit einer kürzeren Überlebenszeit für Patienten mit kolorektalem Karzinom [89]. Ein möglicher Einfluss von kodierenden MACC1 SNPs auf das Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde bisher noch nicht untersucht.

#### 1.4.1.3 MACC1 reguliert MET transkriptionell

MACC1 ist ein wesentlicher MET Regulator und ein hohes MACC1 Level führt somit zu einer verstärkten Aktivierung des HGF/MET Pathways [86, 90]. Außerdem zeigten Pathway Analysen, dass durch eine hohe MACC1 Expression der MAPK Pathway aktiviert wird [86]. Abbildung 1.6 zeigt schematisch, dass bei Stimulierung der Zellen mit HGF MACC1 vom Zytoplasma in den Zellkern wandert und dort an den MET Promoter bindet.



**Abb. 1.6 MACC reguliert MET transkriptionell und aktiviert die Expression von MET.**

Das MACC1 (metastasis associated in colon cancer 1) Protein wandert bei Aktivierung von MET (met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)) vom Zytoplasma in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription von MET. Es wird mehr MET Protein gebildet, welches als funktionsfähiger Rezeptor wiederum den HGF/MET Pathway und somit auch MACC1 aktivieren kann. Abbildung modifiziert nach Arlt und Stein [91].

Die Bindung von MACC1 an den MET Promoter führt zu einer gesteigerten Expression

von MET mRNA und Protein. Der MET Rezeptor gelangt an die Zellmembran, wo wiederum HGF an den Rezeptor binden kann. Der HGF/MET Pathway und der MAPK Pathway sind bedingt durch eine MACC1 Überexpression verstärkt aktiviert. MACC1 bewirkt somit einen positiven Feedback-Loop im HGF/MET Pathway [91, 92] .

Eine hohe MACC1 Expression in kolorektalen [86, 93], rektalen [94], hepatozellulären [95, 96] und ovarialen [97] Karzinomen korreliert mit einer hohen MET Expression. Im Gegenzug führt die verringerte MACC1 Expression in kolorektalen [86] oder ovarialen Karzinomzelllinien [98] zu einer verminderten MET Expression. Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein niedriger Level der MicroRNA-1 und eine zugleich hohe MACC1 Expression zu einer starken MET Überexpression führt [99].

#### 1.4.1.4 MACC1 fördert die Metastasierung

Die Überexpression von MACC1 induziert eine, bei Stimulierung mit HGF, erhöhte Zellproliferation, sowie eine verstärkte Zellmigration und Zellinvasion von kolorektalen Karzinomzelllinien [86]. Bei Reduktion der MACC1 Expression mit MACC1 siRNA oder shRNA verringert sich die Zellproliferation und die Zellmotilität von kolorektalen [86] oder ovarialen Karzinomzelllinien [98]. Auch bewirkt die Micro-RNA 143 eine niedrige MACC1 Expression und somit auch eine verringerte Fähigkeit zum Zellwachstum oder zur Zellmigration und Zellinvasion [100]. *In vivo* fördert MACC1 die Entstehung distanter Metastasen. Zellen mit einer erhöhten MACC1 Expression fördern in Xenograft Modellen die Tumorprogression und die Bildung von Leber- und Lungenmetastasen [86, 101]. Eine durch shRNA reduzierte MACC1 Expression vermindert die Bildung von Metastasen in Xenograft Modellen [86, 101].

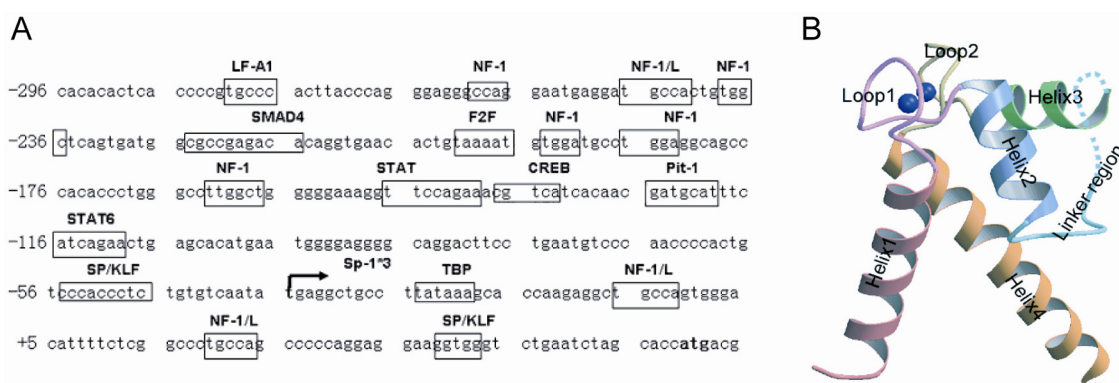
Humane kolorektale Tumore der Stadien I bis III, die eine hohe MACC1 Expression aufweisen, entwickeln signifikant häufiger metachrone Metastasen. Zudem ist das metastasenfreie Überleben der Patienten stark verringert. So korreliert eine hohe MACC1 Expression in 78% der kolorektalen Tumoren mit metachroner Metastasierung. Weiterhin überleben 80% der Patienten mit einer niedrigen MACC1 Expression die ersten fünf Jahre nach Diagnose, während hingegen nur 15% der Patienten mit einer hohen MACC1 Expression überleben [86]. Sowohl in kolorektalen Tumoren [86, 102], als auch in hepatozellulären Karzinomen [103], Magenkarzinomen [104], Bronchialkarzinomen [105] oder Ovarialkarzinomen [97] ist MACC1 im Vergleich zum normalen Gewebe stärker exprimiert und korreliert mit einem höheren UICC-Stadium und/oder mit Metastasierung.

## 1.4.2 S100P (S100 calcium binding protein P)

### 1.4.2.1 Das S100P Gen und Protein

1992 wurde S100P als neues Protein, welches in der humanen Plazenta entdeckt wurde, beschrieben [106]. Die S100-Familie besteht aus mehr als 20 Mitgliedern. Die Ähnlichkeiten der DNA-Sequenzen in der S100-Familie liegen zwischen 22 und 57% [107]. S100-Gene sind im Cluster auf dem Chromosom 1q21 lokalisiert, wobei das S100P Gen das einzige Gen ist, welches auf Chromosom 4p16.1 liegt [108]. Das Gen beinhaltet zwei Exons. In der Promoterregion sind Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie z. B. SMAD, STAT/CREB und SP/KLF zu finden [109] (Abb. 1.7 A). Der Promoterbereich weist mehrere CpG-Inseln auf, die zu einer Hypermethylierung und damit zu einer Stilllegung der Transkription führen können. Eine Hypomethylierung von S100P wurde z. B. in Prostatakarzinomzelllinien festgestellt [110].

S100P gehört zu den Calciumbindenden Proteinen, in deren Proteinstruktur eine helix-loop-helix Konformation (EF-Hand) mit zwei Bindungsstellen für Calciumionen zu finden sind (Abb. 1.7 B). Weiterhin werden im Protein zusätzlich Zink- und Magnesiumionen gebunden. Die Calciumionen induzieren eine Konformationsänderung des Proteins, welche die Bindung von Zielproteinen ermöglicht [108]. Das S100P Protein besteht aus 95 Aminosäuren. Das Protein ist extrazellulär oder intrazellulär, im Zytoplasma oder im Nukleus, lokalisiert und hat bedeutende Funktionen im Zellzyklus und in der Zelldifferenzierung.



**Abb. 1.7 Die S100P Promotersequenz und das S100P Protein.**

A) Die S100P Promotersequenz -296 bp bis +65 bp mit den Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ist dargestellt [109, 111]. B) Das S100P Protein hat eine für die S100-Familie typische EF-Hand Region mit Bindungsstellen für Calciumionen [112].

Die Transkription von S100P wird u. a. durch BMP-4 (bone morphogenetic protein 4)



aktiviert [113]. BMP-4 ist ebenso ein wichtiger Regulator in der EMT und trägt zum metastatischen Phänotyp bei. Die Bindung von EZR (ezrin) an das S100P Protein bewirkt die Translokation des Proteins vom Zytoplasma zur Zellperipherie [114]. Währenddessen stimuliert die Bindung von S100PPBPR (S100P binding protein) die Translokation von S100P in den Zellkern [115]. Das EZR Protein steht in Verbindung mit dem Zytoskelett der Zelle und hat eine wesentliche Aufgabe bei der Migration von Tumorzellen [116]. Das S100P Protein interagiert mit weiteren Proteinen, wie z. B. IQGAP1 (IQ motif containing GTPase activating protein 1) [117], SGT1 (SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 *S. cerevisiae*) [118], CacyBP (calcyclin binding protein) [119] und RAGE (receptor for advanced glycation end-products) [120].

#### 1.4.2.2 S100P und Metastasierung

In neuster Zeit wird S100P vor allem im Zusammenhang mit Tumorprogression, Metastasierung und Resistenzverhalten gegen Chemotherapeutika beschrieben. Die S100P Expression in Tumoren, wie z. B. im kolorektalen Karzinom [121], Cholangiokarzinom [122], Pankreaskarzinom [123, 124], Mammakarzinom [125], Prostatakarzinom [126] und Bronchialkarzinom [127], ist höher als im Normalgewebe und korreliert beim Mammakarzinom und Bronchialkarzinom mit einer schlechten Prognose für den Patienten. Mittels genomweiter Analyse wurde festgestellt, dass S100P im flächigen Adenom stärker exprimiert ist als in der normalen Darmmukosa [128]. In Doxorubicinresistenten Kolonkarzinomzelllinien ist S100P hochreguliert [129]. Eine hohe S100P Expression induziert die Proliferation und Migration der Kolonkarzinomzelllinie SW480. Dabei bindet S100P an RAGE und aktiviert den MAPK und NFκB Pathway [130]. Eine reduzierte Expression von S100P in den Kolonkarzinomzelllinien DLD1 und SW620 führt zu einer verminderten Zellproliferation, Zellmigration und Invasion, sowie zu einem verminderten Tumorwachstum und zur verringerten Bildung von Lebermetastasen *in vivo* [131]. Kürzlich wurde gezeigt, dass ein Antagonist, der die Bindung von S100P an RAGE unterbindet, Zellmigration *in vitro* und Metastasierung *in vivo* inhibiert [132]. S100P spielt vor allem eine Rolle bei der Metastasierung von Kolonkarzinomzellen in die Leber. In einer Studie wurden SW620 Zellen orthotop in ein Xenograft Mausmodell eingebracht. Zellen, die nach einiger Zeit Lebermetastasen bildeten, wurden auf Genexpression analysiert. S100P war in den Subklonen, die in die Leber metastasierten, wesentlich höher exprimiert als in anderen Subklonen [133].

Zudem zeigten humane kolorektale Tumore, die in die Leber metastasierten eine

höhere S100P Protein Expression als nicht metastasierende Tumore [133]. In 96 kolorektalen Tumoren war die S100P mRNA und Protein Expression wesentlich höher als in den dazugehörigen normalen Geweben. Die S100P Expression korrelierte in dieser Studie mit dem Methylierungsstatus des S100P Promoters [121]. Wang et al. postulierten, dass S100P ein neuer Biomarker für das kolorektale Karzinom sein könnte [121].

#### 1.4.3 SPON2 (spondin 2, extracellular matrix protein)

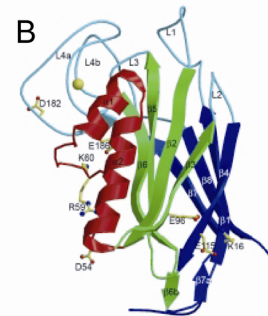
##### 1.4.3.1 Das SPON2 Gen und Protein

Das Gen SPON2 (auch als Mindin oder DIL1 bezeichnet) liegt auf Chromosom 4p16.3 und besteht aus sechs Exons. In dem Promoterbereich befinden sich Bindungsstellen für THRA und THRAB (thyroid hormone receptor alpha/beta) [134] (Abb. 1.8 A).

Das extrazelluläre Matrixprotein SPON2 besteht aus 331 Aminosäuren und gehört zur Mindin/F-Spondin Familie. Die Proteinstruktur ist sehr ähnlich zu der von Mindin1/2 und M-Mindin des Zebrafisches. Das Protein besteht aus einer hydrophoben Signalsequenz am N-Terminus, einer FS1-FS2 (F-Spondin) Domäne (Abb. 1.8 B) und sechs Thrombospondin Type I Repeats (TSR-I) am C-Terminus [135].

A

```
-444 atggcttgca aatgccctct ggccacagtg cagaccgcta ggctgttctg tgcagcttta
-384 ggccatgcca ggaaagagac ttaaagccag ggccccaag gccagggatg cctgcgccgg
-324 gagccaggag ctccccagc cactccagc atgtagactg aagtcaggcc acgcacaggg
-264 ctctccaggt cacaccctgc gcaagaaggt gtagcacgct ggctctaata
```



**Abb. 1.8 Die SPON2 Promotersequenz und das SPON2 Protein.**

A) Die Sequenz zeigt den SPON2 Promoterbereich (-444 bp bis -215 bp) vor dem Transkriptionsstart, welcher im Zuge dieser Arbeit untersucht wurde. B) Die Struktur der F-Spondin Domäne des SPON2 Proteins ist dargestellt [135]. Die Funktion der F-Spondin Domäne ist noch unbekannt.

In einer Studie von Yan et al. wurde festgestellt, dass SPON2 vor Hypertrophie und Herzinsuffizienz durch Inhibierung des AKT/GSK3 $\beta$  und des TGF- $\beta$ 1-Smad Signalweges schützt [136]. *In vitro* Studien zeigten, dass F-Spondin (auch SPON1 genannt) und Mindin des Zebrafisches das Wachstum von embryonalen Neuronen im Hippocampus fördern [137]. Weiterhin reguliert SPON2 die Expression von Rho

GTPasen in dendritischen Zellen [138]. SPON2 spielt zudem eine Rolle in der Immunabwehr. Das Protein ist ein Ligand für Integrine und die SPON2/Integrin Interaktion bewirkt die Rekrutierung von Leukozyten an den Entzündungsherd [139]. Studien zeigten zudem, dass die SPON2 Expression in Makrophagen sehr hoch ist [140]. Transgene Mäuse, die SPON2 nicht exprimierten, wiesen eine defekte Immunabwehr auf. SPON2 defiziente Makrophagen konnten nicht mehr auf externe Stimulierung reagieren. SPON2 ist demnach ein Erkennungsmolekül für Pathogene [141].

#### 1.4.3.2 SPON2 und Metastasierung

SPON2 wurde zunächst DIL1 (differentially expressed in cancerous and noncancerous lung cells) genannt, da es im normalem Lungengewebe höher exprimiert ist als im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom. Es wurde daher angenommen, dass SPON2 als Tumorsuppressorgen wirken könnte [142]. Edwards und Kollegen aber zeigten, dass die SPON2 Expression im Tumorgewebe, wie z. B. im Prostatakarzinom, höher ist als im Normalgewebe [143]. Auch Romanuik et al. demonstrierten, dass SPON2 Level in Prostatakarzinomen erhöht sind [144]. Hohe SPON2 Level liegen u. a. im Ovarialkarzinom und Magenkarzinom [145, 146], als auch im Adenom [147], vor. Studien über SPON2 als möglichen Biomarker für das Ovarialkarzinom sind kontrovers. Simon et al. zeigten, dass SPON2 im Serum von Ovarialkarzinom-Patienten deutlich erhöht ist [145]. Dennoch demonstrierte Anderson und Kollegen, dass die SPON2 Konzentration vor Diagnose nicht ausreichend erhöht ist, um SPON2 als zuverlässigen Biomarker für das Ovarialkarzinom bestätigen zu können [148]. Die SPON2 Konzentration ist auch im Serum von Prostatakarzinompatienten erhöht und der Test von SPON2 im Serum zeigt eine hohe Sensitivität und Spezifität. Der herkömmliche PSA Test könnte durch eine zusätzlichen SPON2 Analyse ergänzt werden [149].

In *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass die verminderte SPON2 Expression in der Leberepithelzelllinie HuH7 zu einer gesteigerten Zellmigration führt. Währenddessen bewirkt eine SPON2 Überexpression in der Zelllinie J7 eine niedrige Zellmigration [134].

Weiterführende Versuche, ob die SPON2 Expression einen Effekt auf die Zellproliferation oder Migration anderer Zelllinien hat, wurden bisher noch nicht durchgeführt. Ein möglicher Einfluss von SPON2 auf die Metastasierung beim kolorektalen Karzinom ist bislang unbekannt.

### 1.5 Zielstellung der Arbeit

Die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms ist zugleich verbunden mit einer schlechten Überlebensprognose für den Patienten. Die Expression des Gens MACC1 dient als neuer prognostischer Marker für die Identifizierung von Patienten mit einem hohen Metastasierungsrisiko.

Bislang wurde noch nicht analysiert, ob Mutationen im kodierenden Bereich des MACC1 Gens einen Einfluss auf die Metastasierung oder auf das Überleben des Patienten haben. Es sollte deshalb untersucht werden, ob Mutationen in den kodierenden MACC1 Exons von humanen kolorektalen Tumoren auftreten. Zudem sollten die häufig mutierten Exons des transkriptionellen Targetgens von MACC1, das Gen MET, auf Mutationen untersucht. Mittels biologischer Assays mit Kolonkarzinomzellen sollte geprüft werden, ob MACC1 Mutationen einen Einfluss auf die funktionalen Eigenschaften des MACC1 Proteins haben. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Mutationen in MACC1 Exons mit klinischen Parametern, wie z. B. UICC-Stadien, Tumordinfiltrationstiefe, Lymphknotenstatus, metachroner Metastasierung oder Überleben der Patienten assoziiert sind.

Weiterhin sollten mittels genomweiter Analyse transkriptionelle Targetgene von MACC1 identifiziert werden. Mit Hilfe funktionaler *in vitro* Assays sollte der Einfluss der Expression ausgewählter Targetgene auf die Proliferation und Motilität von Kolonkarzinomzellen geprüft werden. Außerdem sollte anhand von Xenograft Modellen und humanen kolorektalen Tumoren das Metastasierungspotenzial dieser Gene bewertet werden. Metastasierungs-induzierende Gene könnten als Biomarker für das metastasierende kolorektale Karzinom oder als Zielgene zur Inhibierung der kolorektalen Metastasierung dienen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Klonierungen

Zur stabilen Überexpression der Gene S100P und SPON2 in Zelllinien wurden Plasmide mit der full length S100P- und SPON2-cDNA kommerziell erworben (Open Biosystems). Diese cDNAs wurden in den Vektor pcDNA3.1D (Invitrogen) umklont, der Leervektor pcDNA3.1D wurde jeweils als Kontrolle verwendet. Für die Umklonierungen wurden Primer entworfen, die an die jeweiligen cDNAs binden und Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und NotI beinhalten. Die cDNAs wurden mittels dieser spezifischer Primer und dem PWO-Master (Roche) nach Herstellerangaben vervielfältigt. Hierfür wurden 50 ng der cDNA, jeweils 0,4 µM der Primer und 25 µl des PWO-Masters in einem 50 µl Ansatz eingesetzt. Die PCR lief in einem T3000 Thermocycler (Biometra) mit einem Denaturierungsschritt für 3 min bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen von 1.) Denaturierung bei 94°C für 30 s, 2.) Annealing bei 60°C für 30 s und 3.) Elongation bei 72°C für 1 s. Abschließend erfolgte eine Elongation bei 72°C für 5 min und eine Abkühlung auf 4°C. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel (für S100P: 185 bp und für SPON2: 993 bp) mit Hilfe des Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitex) extrahiert. Sowohl die PCR-Produkte als auch der Leervektor wurden mit den Restriktionsenzymen FastDigest BamHI und FastDigest NotI (beide Enzyme Fermentas) bei 37°C für 1 h gespalten. Für die Ligation wurde ein Vektor-Insert Verhältnis von 1:5 angesetzt und das PCR-Produkt wurde in einem 10 µl Ansatz bestehend aus 5 U T4 DNA Ligase (Fermentas) und 1x T4 DNA Ligase Buffer (Fermentas) über Nacht bei 16°C in das Plasmid ligiert. Anschließend wurden Efficiency DH5α Competent Cells (Invitrogen) mit dem gesamten Ligationsansatz transformiert, auf Agarplatten (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien in LB (lysogeny broth)-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) kultiviert; nach 16 h wurden die Plasmide isoliert (Invisorb Spin Plasmid Mini Two, Invitex) und zur Sequenzierung (Invitex GmbH, Berlin) gegeben. Klone mit der richtigen Sequenz wurden in einer großen Kultur herangezogen und die Plasmide mittels Maxipräparation Kit isoliert (Maxipräp No Endo JETSTAR 2.0 Maxi, Genomed).

Für den Knockdown der Gene S100P und SPON2 in Zelllinien wurden 55 bp Oligos mit Hilfe der Kits pSilencer 4.1-CMV neo (Applied Biosystems) bzw. pSilencer 2.1-U6 Neo (Life Technologies) in die jeweiligen Vektoren kloniert. Hierfür wurden Oligos

entworfen, die spezifisch an die S100P und SPON2 mRNA binden und sowohl eine Loop-Sequenz als auch Restriktionsschnittstellen besitzen. Diese sense und antisense Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben annealed, mit den Restriktionsenzymen gespalten und in die offenen Vektoren ligiert. Die jeweiligen Leervektoren wurden als Kontrollen in den Versuchen verwendet.

Die Plasmide pcDNA3.1D/Luciferase pcDNA3.1D/MACC1 wurde freundlicherweise von der AG Stein zur Verfügung gestellt. Eine Zusammenfassung aller im Zuge dieser Arbeit verwendeten Plasmide befindet sich in Tab. 2.1.

Tab. 2.1 Verwendete Plasmide

Vektor	Enthaltene Sequenzen	Resistenzgen
pcDNA3.1D/MACC1/wt	MACC1 Wildtyp Sequenz	Neomycin
pcDNA3.1D/MACC1/L31V	MACC1 Sequenz: ctc → gtc (rs4721888)	Neomycin
pcDNA3.1D/MACC1/S515L	MACC1 Sequenz tcg → ttg (rs975263)	Neomycin
pcDNA3.1D/MACC1/R804T	MACC1 Sequenz: aga → aca (rs3735615)	Neomycin
pcDNA3.1D (Invitrogen)	Leervektor	Neomycin
pcDNA3.1D/S100P	Full length S100P cDNA mit V5- und His-Tag	Neomycin
pcDNA3.1D/SPON2	Full length SPON2 cDNA mit V5- und His-Tag	Neomycin
pSil4.1/Kontroll-shRNA (Applied Biosystems)	Leervektor	Neomycin
pSil4.1/S100P-shRNA	Zielsequenz für S100P: aatggagatgccaggtggactctctgaagt ccacctgggcatctcca	Neomycin
pSil2.1/Kontroll-shRNA (Life Technologies)	Leervektor	Neomycin
pSil2.1/SPON2-shRNA	Zielsequenz für SPON2: agcttgcgcatagctccgactacagctctcttg aagctgtagtcggagctatgcg	Neomycin
pcDNA3.1D/Luciferase	Leervektor	Puromycin

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zelllinien

Die verwendeten Kolonkarzinomzelllinien wurden von ATCC erworben. Die Zellen wurden auf Mykoplasmen negativ getestet und die Authentifizierung der Zellen wurde mittels short tandem repeat (STR) Genotypisierung überprüft (DSMZ GmbH). Der Genotyp stimmte mit dem publizierten Genotyp überein und die Zellen wurden demnach als „authentisch“ erklärt. Der Zellklon SW480/MACC1 (Klon 43) wurde von

der AG Stein freundlicher Weise zur Verfügung gestellt, die anderen Klone wurden im Zuge dieser Arbeit generiert (siehe Kapitel 2.2.3). Die Zelllinien wurden in RPMI-1640 (PAA Laboratories) oder DMEM Medium (PAA Laboratories) kultiviert (siehe Tab. 2.2). Alle Zelllinien wuchsen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einer wasserstoffgesättigten Atmosphäre. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zelllinien passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS (PAA Laboratories) gewaschen und mit Trypsin/EDTA (PAA Laboratories) für 3 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Trypsinierung durch Medium gestoppt und die Zellen je nach Verwendungszweck 1:3 bis 1:20 gesplittet. Alle Zelllinien wurden mit einer geringen Passagenzahl bei -80°C oder bei längerer Lagerung in flüssigen Stickstoff weggefroren. Dabei wurden ca. 5x10<sup>6</sup> Zellen, in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit DMSO (Invitrogen) und 10% fötalen Kälberserum (FKS; PAA Laboratories) versetzt.

Tab. 2.2 Zusammenfassung der verwendeten Kolonkarzinomzelllinien

<b>Zelllinien (ATCC-Nummer)</b>	<b>Medium</b>	<b>Eigenschaften</b>
SW480 (CCL-228)	RPMI-1640, 10% FKS	Etabliert aus einem kolorektalen Adenokarzinom
SW620 (CCL-227)	RPMI-1640, 10% FKS	Isoliert aus einer Lymphknotenmetastase, gleicher Patient wie bei SW480
DLD1 (CCL-221)	DMEM, 10% FKS	Etabliert aus einem kolorektalen Adenokarzinom
HCT116 (CCL-247)	DMEM, 10% FKS	Etabliert aus einem kolorektalen Adenokarzinom

### 2.2.2 Transfektion von Plasmiden, shRNA-Plasmiden oder siRNA

Die Zelllinien wurden zur funktionalen Analyse der MACC1 SNPs mit MACC1 Plasmiden transient transfiziert. Für eine S100P oder SPON2 Überexpression oder zum stabilen Knockdown dieser Gene wurden Zellen mit Plasmiden stabil transfiziert. Die Lipofektion wurde mit Metafectene Pro (Biontex) oder Fugene HD (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die siRNA-Transfektion wurde Oligofectamin (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll verwendet. SW620 Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 40 nM mit S100P-, SPON2- oder Kontroll-siRNA (S100P: s12443, Applied Biosystems, SPON2: s20370, Applied Biosystems, Kontroll-siRNA: Negative siRNA, Applied Biosystems) transfiziert.

### 2.2.3 Generierung von Zellklonen

Ca.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden in 10 cm Petrischalen oder etwa  $3 \times 10^5$  Zellen in 6-Well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen SW480 mit den unterschiedlichen pcDNA3.1D-Konstrukten (siehe Tab. 2.1) zur Überexpression der Gene transfiziert (SW480/Vektor, SW480/S100P, SW480/SPON2 Zellen) oder SW620 Zellen wurden mit pSilencer-Plasmiden (siehe Tab. 2.1) zur Reduktion der S100P oder SPON2 Genexpression (SW620/Kontroll-shRNA, SW620/S100P-shRNA, SW620/SPON2-shRNA) transfiziert. 48 h nach Transfektion erfolgte die Selektion der Zellen für ca. 10 Tage mit 1 mg/ml Neomycin (G418, PAA). Ebenfalls wurden SW480-Zellklone für Tierversuche generiert, welche bereits durch stabile Transfektion eine hohe S100P und SPON2 Expression aufwiesen. Diese wurden anschließend zusätzlich mit dem Plasmid pcDNA3.1D/Luciferase transfiziert (SW480/Vektor\_Luc, SW480/S100P\_Luc, SW480/SPON2\_Luc). Die Zellen wurden täglich mit 1 µg/ml Puromycin (Clontech) und zusätzlich 2x wöchentlich mit 1 mg/ml Neomycin behandelt. Nach ca. 1-2 Wochen hatten sich einzelne Zellkolonien gebildet, die nun mit Hilfe von sterilen Zellkulturringen gepickt wurden. Dafür wurden die Zellen mit 30 µl Trypsin gelöst und in ebenfalls 30 µl Medium aufgenommen. Diese Zellklone wurden in Wells einer 96-Well Platte transferiert, kultiviert und weiterhin 2x wöchentlich mit den zuvor verwendeten Antibiotika behandelt. Die Expression des gewünschten Gens in den Zellklonen wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR (qRT-PCR) und Western Blots geprüft. Die Luciferase Aktivität in den Klonen für die Tierversuche wurde mittels Luciferase Assays im 96-Well Format ermittelt. Hierfür wurde nach Herstellerangaben das Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega) verwendet. Die gemessene Lumineszenz der aktiven Luciferase wurde im Infinite M200 Pro Reader (TECAN) bestimmt. Für die *in vivo* Versuche wurden nur Zellklone mit gleich starker Luciferase Aktivität verwendet.

## 2.3 Mutationsanalyse

### 2.3.1 Patientengewebe

Insgesamt wurden 154 Patienten mit primären kolorektalen Tumoren (Adenokarzinome) in diese Studie einbezogen (genehmigt von der Ethik-Kommission der Charité Berlin). Das Kollektiv der 60 Tumore, die für die Genexpressionsanalysen von S100P und SPON2 verwendet wurde, ist ein Teil dieses Tumorpanels. Alle kolorektalen Tumore mit klinischen Daten sind im Anhang (Tab. 1) aufgelistet.



Eine Übersicht aller Patientendaten befindet sich in Tab. 2.3. Die Tumore wurden sofort nach der Operation in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das Tumor Staging wurde anhand der Leitlinien der Union for International Cancer Control (UICC) und der World Health Organization (WHO) durchgeführt. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnose unbehandelt, sie hatten kein hereditäres kolorektales Karzinom, sie hatten keinen zweiten Tumor einer anderen Entität und erhielten eine vollständigen Entfernung des Tumorgewebes. 29 aller 154 Patienten entwickelten metachrone Metastasen. Das Follow-up der Patienten wurde vom Zeitpunkt der Diagnose 5 Jahre bis 14 Jahre danach (mit einem medianen Follow-up von 6,3 Jahren) dokumentiert. Das Gesamtüberleben wurde vom Zeitpunkt der histopathologischen Untersuchung des Tumors bis zum Tod des Patienten berechnet. Das metastasenfreie Überleben wurde vom Zeitpunkt der histopathologischen Untersuchung bis zur Entstehung von distanten Metastasen ermittelt.

Tab. 2.3 Charakteristika der Patienten mit kolorektalem Karzinom

<b>Charakteristika der Patienten</b>	<b>Anzahl an Patienten (%)</b>
Europäer	154 (100%)
Männlich	79 (51%)
Weiblich	75 (49%)
Alter < 60 Jahre	40 (26%)
Alter 60-70 Jahre	57 (37%)
Alter > 70 Jahre	57 (37%)
Lokalisation im Kolon	105 (68%)
Lokalisation im Rektum	49 (32%)
ohne metachroner Metastasierung	29 (19%)
mit metachroner Metastasierung	125 (81%)
UICC-Stadium I	26 (17%)
UICC- Stadium II	74 (48%)
UICC- Stadium III	54 (35%)
Tumor-Status: T1+T2	36 (23%)
Tumor-Status: T3+T4	118 (77%)
ohne Lymphknotenmetastasen	101 (66%)
mit Lymphknotenmetastasen	53 (34%)

### 2.3.2 Mikrodissektion von kolorektalen Tumoren

Von den kryokonservierten Tumoren wurden mittels Kryomikrotom 5-10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Der letzte und der erste Schnitt einer Serie wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und vom Pathologen Dr. W. Hänsch (Charité, Berlin) begutachtet. Dabei wurden nur die Tumorareale gekennzeichnet, das Stromgewebe blieb unmarkiert. Anschließend wurden die Tumorzellareale von den

Objektträgern mit einer sterilen Kanüle entfernt und die Zellen für RNA-Extraktion in TRIzol (Invitrogen) oder zur Gewinnung von genomischer DNA in ATL-Puffer (Qiagen) aufgenommen.

### 2.3.3 Extraktion von DNA und RNA aus humanen kolorektalen Tumoren

Zur RNA-Isolierung wurden die Zellen mit einem Ultraschall-Homogenisator (SONOPULS HD, Bandelin electronic) wiederholt für 15 Pulse fragmentiert. Anschließend wurden die Proben nach Standardprotokoll mit Chloroform versetzt, homogenisiert und bei 11200 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppi überführt und erneut mit Chloroform versetzt, und zentrifugiert. Danach wurde wiederum die obere Phase in ein neues Eppi transferiert und mit Isopropanol versehen. Zur Fällung der RNA wurde bei 13000 rpm, 10 min, 4°C zentrifugiert und das Pellet wurde anschließend mit 70%igen Ethanol gewaschen und getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 20 – 60 µl sterilem Wasser aufgenommen. Genomische DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll extrahiert. Die DNA wurde von den Säulen mit 30 – 50 µl sterilem Wasser eluiert.

### 2.3.4 PCRs und Sequenzierung

Die genomische DNA der kolorektalen Tumore wurde für die Mutationsanalyse verwendet. Es wurden alle kodierenden Exons von MACC1 (Exons 4-7) und die Exons 14-19 von Met mittels PCR amplifiziert. Die Primersequenzen sind in Tab. 2.4 aufgeführt.

Es wurde die Proof-reading PFU DNA Polymerase (Fermentas) verwendet. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 50 µl angesetzt, bestehend aus 1x Pfu Buffer mit 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> (Fermentas), 0,2 mM von jeden dNTP (Applied Biosystems), 0,3 µM von den Primern, 25 ng DNA und 2,5 U PFU DNA Polymerase. Die PCR lief im T3000 Thermocycler mit einem Denaturierungsschritt für 3 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen von 1.) Denaturierung bei 95°C für 30 s, 2.) Annealing bei 60°C für 30 s und 3.) Elongation bei 72°C für 1 s und einer Endelongation bei 72°C für 5 min.

Die PCR-Produkte wurden von der AGOVA GmbH (Berlin) mittels enzymatischer Spaltung gereinigt und sequenziert.

Tab. 2.4 Verwendete Primer zur Amplifikation der MACC1 und Met Exons

Gen	Primer	Sequenz 5'-3'
MACC1, Exon 4	Primer Fwd	atctagtcgagtatcctaccag
	Primer Rev	cagaggtagaccttcaacaattat
MACC1, Exon 5.1	Primer Fwd	cttgattgtaactcacagtgcc
	Primer Rev	gaggttgctaacaatgatttc
MACC1, Exon 5.2	Primer Fwd	gaattccaagaggtgtctctaag
	Primer Rev	cttcacctgcttccaactgc
MACC1, Exon 5.3	Primer Fwd	ggacacaattatatgccaggac
	Primer Rev	gcagtgtacaagtccaatcttac
MACC1, Exon 5.4	Primer Fwd	ggacacaattatatgccaggac
	Primer Rev	gcagtgtacaagtccaatcttac
MACC1, Exon 5.5	Primer Fwd	gcagtgtctaagacaaagcaag
	Primer Rev	catttctcctctcacatggttcag
MACC1, Exon 6	Primer Fwd	ctctggcttagttatgtctactg
	Primer Rev	gtgaatccgtgaatgtggtatg
MACC1, Exon 7	Primer Fwd	gtccatgtgtaattggtattccg
	Primer Rev	tctgagattctttcttctacac
Met, Exon 14	Primer Fwd	gtcgattcttggtgtgtctctt
	Primer Rev	cagaggtaaatacttccttagg
Met, Exon 15	Primer Fwd	gctaccactgcttccattcttaaggac
	Primer Rev	ttgcttccatgcacaagggaatcc
Met, Exon 16	Primer Fwd	gcttatatccttgggtgaaatgtgtgcatc
	Primer Rev	atgagggctctgagggatcatttcag
Met, Exon 17	Primer Fwd	aaccctcaggacaagatgctaa
	Primer Rev	gggtgcatttgaatgatgctaaca
Met, Exon 18	Primer Fwd	aggcttgagccattaagaccaa
	Primer Rev	ccagggcttacacatcgattta
Met, Exon 19	Primer Fwd	gaggccagatgaaatacttct
	Primer Rev	atgaagaaaactggaattggtggt

### 2.3.5 Site-directed mutagenesis

Nach Angaben des Herstellers wurden mittels QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) einzelne Nukleotide in der MACC1 Sequenz ausgetauscht. Die entworfenen Primersequenzen mit den ausgetauschten Nukleotiden in der Sequenz sind in Tab. 2.5 zusammengefasst.

Tab. 2.5 Verwendete Primer für die site-directed mutagenesis

Gen	Primer	Sequenz 5'-3'
MACC1, Exon 4, ctc → gtc (L31V)	Primer Fwd	gaagctggaaaagtctcaaaaagtt
	Primer Rev	aacttttgagactttccagcttc
MACC1, Exon 5, tcg → ttg (S515L)	Primer Fwd	taaaaagactcttgaatctgccagg
	Primer Rev	cctggcagattcaagagtctttta
MACC1, Exon 7, aca → aga (wt)	Primer Fwd	gaaataactacagagatgtgttaca
	Primer Rev	tgtaacacatctctgtagtatttc

Die modifizierten Plasmide pcDNA3.1D/MACC1/L31V, pcDNA3.1D/MACC1/S515L, pcDNA3.1D/MACC1/wt (pcDNA3.1D/MACC1/R804T wurde von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt) wurden für die Transfektion von Zelllinien verwendet (siehe 2.5).

## 2.4. Genexpressionsanalysen

### 2.4.1 RNA Isolierung aus Zelllinien

Die RNA, die für die Microarray-Analysen verwendet wurde, wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) extrahiert. Für alle anderen Versuche wurde die RNA aus Zelllinien mittels Universal RNA Purification Kit (GeneMatrix; Roboklon) nach Herstellerprotokoll isoliert. Wenn die Zellen zuvor mit Plasmid transfiziert wurden, wurde die DNA auf der Säule mit 10 U DNase (Roche) für 10 min bei RT verdaut. Anschließend wurde nach Protokoll des Herstellers mit den Waschschritten weiterverfahren. Die RNA wurde mit 40 – 60 µl sterilem Wasser von der Säule eluiert.

### 2.4.2 Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der RNA oder DNA wurde am Nanodrop-Spektrophotometer (Thermo Scientific) gemessen. RNA, die für Expressionsarrays verwendet wurde, hatte einen 260 nm/230 nm-Wert von ca. 2,0 und einen 260 nm/280 nm-Wert zwischen 1,9 und 2,0.

Zudem wurde für die Expressionsarrays die Qualität der RNA mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) überprüft. Für die Arrays wurde nur RNA verwendet, die einen RIN-Quotienten zwischen 9,0 und 10,0 aufwies. Zusätzlich wurde die Qualität der 18 S rRNA und 28 S rRNA auf den vom Bioanalyzer erstellten Gelbildern ermittelt.

### 2.4.3 Expressions-Microarrays

Unterschiede in der Genexpression der Zellklone SW480/Vektor und SW480/MACC1 wurden mittels genomweiter Analyse ermittelt. Hierfür wurde der 4x44 K Whole Human Genome Microarray (Agilent Technologies) verwendet, bei dem vier Microarrays auf einem Objektträger sind. Die Durchführung der Microarrays wurde in Kooperation mit der AG Kemmner (Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) ausgeführt. Die Arrays wurden jeweils in Duplikaten durchgeführt, wofür zwei unterschiedliche Passagen der Zellklone verwendet wurden. Jeweils 900 ng RNA wurde in cRNA

umgeschrieben, mit Cy3-markierten dCTPs (grün) gelabelt, auf die Microarrays hybridisiert und gescannt. Die Daten wurden mit der GeneSpring GX Software (Agilent Technologies) ausgewertet. Die Auswertung wurde von Matthew Huska und Miguel Andrade (Bioinformatik Core Facility des Max-Delbrücks Centrums für Molekulare Medizin, Berlin) durchgeführt. Pathway-Analysen von differentiell regulierten Genen wurden mit Hilfe des Functional Annotation Tool von DAVID Bioinformatics Resources 6.7 erstellt [150, 151].

#### 2.4.4 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde jeweils 50 ng RNA, 250 ng RNA für die Standardkurve, transkribiert. In einem 20 µl Ansatz wurden Random Hexamere, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x RT Buffer, 250 µM gepoolte dNTPs, 1 U RNase inhibitor und 2,5 U MuLV reverse Transcriptase (alle Reagenzien von Applied Biosystems) eingesetzt. Die Reaktion lief in einem T3000 Thermocycler bei 42°C für 15 min und bei 99°C für 5 min, und wurde abschließend bei 4°C gekühlt. Die cDNA wurde über Nacht bei 4°C, für eine längere Lagerung bei -20°C, aufbewahrt.

#### 2.4.5 Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Primer und Probes für die Quantifizierung der Genexpression von MACC1, S100P und SPON2 sind in Tab. 2.6 aufgelistet.

Tab. 2.6 Zusammenfassung der für qRT-PCR verwendeten Primer und Sonden

Gen	Primer oder Sonden	Sequenz 5'-3'
MACC1	Primer Fwd	ttcttttgattcctccggtga
	Primer Rev	actctgatgggcatgtgctg
	FITC-probe	gcagacttcctcaagaaattctggaagatcta-FITC
	LCRed640	LCRed640-agtggttcagaacttctggacatttagacga
S100P	Primer Fwd	aatctagcaccatgacgg
	Primer Rev	tctgcaggaagcctggta
	FITC-probe	attcgggcagcgagggca-FITC
	LCRed640	LCRed640-acgcagaccctgaccaaggg
SPON2	Primer Fwd	tggtctcgtttggtg
	Primer Rev	ggaggacgttatctcggtca
	FITC-probe	gacagcggcttcaccttctcctc-FITC
	LCRed640	LCRed640-ccaacttcgccaccatccc
GAPDH	Primer Fwd	gaagatggtgatgggatttc
	Primer Rev	gaaggtgaaggtCggagt

Für die Quantifizierung mit Hilfe von Hybridisierungs sonden wurde der Fast Start DNA Master HybProbe Kit (Roche) eingesetzt. Für das Housekeeping Gen wurde der LightCycler hG6PDH Housekeeping Gene Set (Roche) benutzt, welcher Primer und Sonden für das Gen Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) beinhaltet. Wenn die Quantifizierung mit SYBR Green durchgeführt wurde, wurde der GoTaq qPCR Master Mix (Promega) eingesetzt und das Housekeeping Gen Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die PCR wurde in 96-Well Platten in einem 10 µl Ansatz durchgeführt. Das genaue Protokoll richtete sich nach den Angaben der Hersteller. Jede PCR wurde in Duplikaten durchgeführt und diese wurden zu dem jeweiligen Housekeeping Gene normalisiert. Wenn die MACC1 Expression in Tumoren analysiert wurde, wurde zu einem Kalibrator normalisiert. Das Protokoll für die PCR mit Hybridisierungs sonden beinhaltete eine Vorinkubation bei 95°C für 10 min, gefolgt von 45 Zyklen von 1.) Denaturierung bei 95°C für 10 s, 2.) Annealing bei 60°C für 30 s und 3.) Elongation bei 72°C für 4 s. Das PCR Protokoll mit SYBR Green enthielt eine Vorinkubation bei 95°C für 2 min, gefolgt von 45 Zyklen von 1.) Denaturierung bei 95°C für 7 s, 2.) Annealing bei 60°C für 10 s und 3.) Elongation bei 72°C für 5 s. Um Primerdimere oder unspezifische PCR-Produkte zu detektieren wurde eine Schmelzkurve gemessen. Dabei wurde die Temperatur von 65°C auf 95°C mit einer Rate von 0,1°C/s erhöht. Die Daten wurden mittels des Programms LightCycler 480 Software release 1.5.0 SP3 ausgewertet.

#### 2.4.6 Proteinextraktion

Ca.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden trypsiniert und bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 und Protease Inhibitor Cocktail Tablette von Roche) resuspendiert. Die Zellen wurden auf Eis für 30 min lysiert und bei 14000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppi überführt, bei -20°C gelagert oder die Proteinkonzentration wurde direkt bestimmt und für den Western Blot verwendet.

#### 2.4.7 Proteinbestimmung

Die Proteinlysate wurden 1:10 mit PBS verdünnt und in Triplikaten auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Zudem wurde mit einer BSA Lösung (2 mg/ml, Thermo Scientific) in Duplikaten eine Standardkurve angesetzt. Die Proteinkonzentration wurde nach

Herstellerangaben mit dem Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Scientific) gemessen. Die Messung erfolgte im Infinite M200 Pro Reader (TECAN) bei einer Absorption von 560 nm und die Auswertung wurde mit der Magellan 7 Software durchgeführt.

#### 2.4.8 Western Blot

50 µg Gesamtprotein wurde mit 1x NUPAGE loading Buffer (Invitrogen) und 10% Dithiothreitol (DTT; AppliChem) versetzt. Proben wurden bei 95°C für 10 min denaturiert, mit dem Proteinmarker Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas) auf NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Gele (Invitrogen) aufgetragen und bei 200 V für ca. 45 min aufgetrennt. Danach wurden die Proteine per semi-dry Elektroblothing (Transfer Blot SD Cell; Bio-Rad) mit Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol, pH 7,5) bei 20 V für 30–60 min auf eine Hybond C Extra Nitrocellulose Membran (Amersham Biosciences) geblottet. Es wurde anschließend geprüft, ob der Transfer erfolgreich war, wofür die Membran mit Ponceau S Lösung (Sigma) gefärbt und dann in TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5) gewaschen wurde. Die Membran wurde anschließend 1 h bei RT mit dem Blockierungspuffer (TBST, 5% Milchpulver) geblockt. Danach erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung (siehe Tab. 2.7) über Nacht bei 4°C.

Tab. 2.7 Zusammenfassung aller primären und sekundären Antikörper

<b>Zielprotein</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Ver- dünnung</b>	<b>Lösung</b>
<i>Primäre Antikörper</i>			
Anti-human MACC1	Kaninchen, polyclonal IgG, Sigma	1:1000	5% Milchpulver, 1% BSA in TBST
Anti-V5	Maus, monoclonal IgG, Invitrogen	1:1000	2,5% BSA in TBST
Anti-human S100P	Maus, monoclonal IgG, R&D Systems	1:250	5% BSA in TBST
Anti-human SPON2	Maus, polyclonal IgG, Sigma	1:250	5% BSA in TBST
Anti-human $\beta$ -Tubulin	Maus, monoclonal IgM, BD Pharmingen	1:1000	5% BSA in TBST
Anti-human $\beta$ -Aktin	Maus, monoclonal IgG, Sigma	1:10000	2,5% BSA in TBST
<i>Sekundäre Antikörper</i>			
Anti-Kaninchen-HRP	HRP-konjugiert, Promega	1:10000	TBST
Anti-Maus-IgG-HRP	HRP-konjugiert, Pierce	1:10000	TBST
Anti-Maus-IgM-HRP	HRP-konjugiert, Sigma	1:10000	TBST

Die Membran wurde für ca. 30 min mit TBST gewaschen und mit dem zweiten verdünnten HRP-konjugierten Antikörper (siehe Tab. 2.7) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde wiederum mit TBST für 30 – 60 min gewaschen, die Membran wurde für 1 min mit dem ECL Reagenz (100 mM Tris-HCl, 0,025% w/v Luminol, 0,011% w/v Parahydroxycumarsäure, 10% v/v Dimethylsulfoxid, 0,004% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 8,6) inkubiert und die Proteinbanden wurden anschließend mittels CL-XPosure Filme (Pierce) für 1 s bis 20 min detektiert.

## 2.5 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

ChIP wurde mittels EZ-ChIP Kit (Millipore) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Verwendet wurden SW480/Vektor und SW480/MACC1 Zellen, in denen MACC1 an einen V5-Tag gekoppelt ist.  $10 \times 10^6$  Zellen wurden in 10 cm Petrischalen ausgesät, vernetzt und geerntet. Um die DNA zu fragmentieren wurde mittels Ultraschall-Homogenisator für 20-25 Pulse sonifiziert. Die Immunpräzipitation wurde mit den Antikörpern Anti-RNA Polymerase (positiv Kontrolle), Maus IgG (negativ Kontrolle) und Anti-V5 Tag (Probe, siehe Tab. 2.8) durchgeführt. Die Vernetzung des Protein/DNA Komplexes wurde rückgängig gemacht und die DNA über Säulen aufgereinigt. Die Promoterregionen von GAPDH (Kontrolle), S100P und SPON2 wurde mittels PCR mit dem PWO-Master (Roche) vervielfältigt. Die Primersequenzen sind in Tab. 2.8 zu finden. 20 µl der PCR-Produkte und 6 µl des DNA-Markers GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas) wurden auf ein 2%iges Agarosegel (mit 0,005% RedSafe Nucleic Acid Staining Solution; HiSS Diagnostics) aufgetragen. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe von UV-Licht detektiert und das Gelbild wurde dokumentiert. Der ChIP-Assay wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

Tab. 2.8 Verwendete Primer und Antikörper für ChIP-Analysen

<b>Zielprotein</b>	<b>Antikörper</b>	<b>eingesetzt</b>
Anti-V5 Tag	Kaninchen, polyclonal, ChIP geeignet, Abcam	10 µg

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
S100P, Promoterregion	Primer Fwd	cggagacacaggtgaacac
	Primer Rev	gtcatggtgctagattcagac
SPON2, Promoterregion	Primer Fwd	atggcttgcaaatgccctctg
	Primer Rev	attagagccagcgtgctacac



## 2.6. Funktionale Assays

### 2.6.1 Migrationsassay

Migrationsassays wurden mit Boyden Chambers durchgeführt. Transwells mit 12 µm Poren (Invitrogen) wurden zuvor mit RPMI-1640 oder DMEM Medium inkubiert.  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 400 µl Medium wurden in die obere Kammer gegeben, die untere Kammer wurde mit 600 µl Medium gefüllt. Zellen, die von der oberen in die untere Kammer migriert sind, wurden nach 24 h trypsiniert und mit einer Neukammer Zählkammer gezählt. Drei unabhängige Versuche wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt. Die Wells wurden jeweils 10-mal gezählt, der Mittelwert gebildet und es wurde die „x-fache Zunahme“ zum Kontrollklon angegeben.

### 2.6.2 Invasionsassay

Invasionsassay wurden ebenfalls in Boyden Chambers mit 12 µm Poren (Invitrogen) durchgeführt. Matrigel simuliert eine extrazelluläre Matrix, durch die die Zellen hindurch migrieren. Das Matrigel (BD Biosciences) wurde mit Medium 1:3 verdünnt und die Transwells wurden mit 60 µl Matrigel beschichtet.  $5 \times 10^5$  Zellen in 300 µl Medium wurden in die obere Kammer eingesät. Nach 72 h wurden die Zellen in der unteren Kammer wiederum mit der Neukammer-Zählkammer 10-mal gezählt. Der Mittelwert aus den Zählungen wurde gebildet und es wurde die „x-fache Zunahme“ zum Kontrollklon angegeben. Der Assay wurde jeweils in Triplikaten dreimal durchgeführt.

### 2.6.3 Wundheilungsassay

$4 \times 10^5$  Zellen wurden in 6-Well ausgesetzt. Am nächsten Tag wurde mit einer dünnen, sterilen Pipettenspitze eine Lücke in den Zellrasen gekratzt. Diese „Wunde“ wurde täglich mit 10-facher Vergrößerung des Leica DM IL Lichtmikroskops (Leica Microsystems) dokumentiert, bis die Wunde fast zu gewachsen war (für die verwendeten Zelllinien geschah dies am Tag vier). Der Wundheilungsassay wurde zweimal durchgeführt.

### 2.6.4 Proliferationsassay

Um eine Proliferationskurve zu erstellen, wurde dieser Versuch täglich bis zum Tag vier bzw. fünf durchgeführt.  $5 \times 10^3$  Zellen wurde in Triplikaten in transparente 96-well Platten eingesät. Am nächsten Tag wurde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazoliumbromid (MTT; Sigma) mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml hinzugefügt. Die Platte wurde für 2,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurde bei leicht abzulösenden Zellen (z.B. HCT116, DLD1) 10% SDS in 10 mM HCl hinzugefügt und über Nacht lysiert. Waren die Zellen gut adhären (z.B. SW480, SW620) wurde das Medium abgenommen, in DMSO gelöst und die Platte 20 min geschüttelt bis sich der Farbstoff gelöst hatte. Anschließend wurde die Platte im Infinite M200 Pro Reader bei einer Absorption von 560 nm gemessen. Der Assay wurde in Duplikaten in drei unabhängigen Versuchen wiederholt.

#### 2.6.5 Koloniebildungsassay

Der Koloniebildungsassay wurde mit Hilfe von Soft Agar Platten durchgeführt. In eine 6 cm Petrischale wurde zuerst eine Schicht aus 0,5% w/v Agarose, RPMI-1640 Medium und 10% FKS gegossen. Danach folgte eine Schicht aus 0,33% w/v Agarose, RPMI-1640 Medium mit 10% FKS und  $4 \times 10^4$  Einzelzellen. Die Platten wurden bei 37°C in einer wasserstoffgesättigten Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> für 10 Tage inkubiert. Alle drei Tage wurde 2 ml neues Medium hinzugegeben. Es wurden anschließend mit 40-facher Vergrößerung des Leica DM IL Lichtmikroskops (Leica Microsystems) nur die Zellkolonien gezählt, die aus mehr als vier Zellen bestanden. Die Werte der Kontrollklone wurden auf „1“ normalisiert und es wurde die „x-fache Zunahme“ zum Kontrollklon angegeben. Zudem wurden von den Zellen mit 10- und 40-facher Vergrößerung Fotos aufgenommen. Der Assay wurde zweimal wiederholt.

#### 2.7 *In vivo* Metastasierungsstudien

Alle Tierexperimente wurden nach den United Kingdom Coordinated Committee on Cancer Research (UKCCCR) Leitlinien durchgeführt und wurden von dem Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo), Berlin, genehmigt (Genehmigung erteilt am 25.07.2011, Reg 0069/11).

##### 2.7.1 Intrasplenale Applikation von Tumorzellen in Xenograft Modelle

Für die Versuche wurden severe combined immune deficient (SCID) beige (Charles River) oder NOD (Non-Obese Diabetic) SCID (Experimental Pharmacology and Oncology, Berlin) Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden randomisiert in die Kontroll-Gruppe, die S100P-Gruppe und die SPON2-Gruppe eingeteilt. Im ersten Versuch waren zwei SCID beige Mäuse in der Kontroll-Gruppe, drei in der S100P-

Gruppe und zwei Mäuse in der SPON2-Gruppe. Danach wurde der Versuch mit NOD SCID Mäusen wiederholt. Diesmal waren drei Mäuse in der Kontroll-Gruppe, zwei Mäuse in der S100P-Gruppe und sieben Mäuse in der SPON2-Gruppe.

Die Mäuse wurden für die Operation mit 100 mg/kg Ketamin (Bayer Health Care) und 10 mg/kg Rompun (Bayer Health Care) narkotisiert. Ein ca. 1 cm langer Schnitt wurde parietal zur Milz (dextolateral des Rippenbogens) gesetzt, die Milz wurde freigelegt und es wurden in einem Volumen von 50  $\mu$ l  $3 \times 10^6$  Zellen intrasplenal injiziert. Anschließend wurde das Peritoneum vernäht und die Haut geklammert. Mäuse der Kontroll-Gruppe wurden SW480 Zellen mit Leervektor und Luciferase Aktivität (SW480/Vektor\_Luc) appliziert. Mäuse der S100P-Gruppe erhielten SW480 Zellen mit einer Überexpression an S100P und mit Luciferase Aktivität (SW480/S100P\_Luc) und Mäuse der SPON2-Gruppe bekamen SW480 Zellen mit hoher SPON2 Expression und mit Luciferase Aktivität (SW480/SPON2\_Luc) injiziert.

Die Operation wurde zum Teil in der Firma Experimental Pharmacology and Oncology GmbH (Berlin) durchgeführt.

#### 2.7.2 Biolumineszenz-Messungen und Analyse des Tumors und der Metastasen

Zur Messung der Biolumineszenz wurden die Tiere mit Ketamin/Rompun (Bayer Health Care) Injektionsnarkose anästhesiert. Wurde das Imaging in der Firma Experimental Pharmacology and Oncology GmbH durchgeführt, wurden die Mäuse mittels Isofluran (TH. Geyer) Inhalationsnarkose anästhesiert. Anschließend erhielten sie durch intraperitoneale Applikation 150 mg/kg in PBS gelöstes Luciferin (Promega) um die in den Zellen vorhandene Luciferase zu aktivieren und somit die Lumineszenz auszulösen. Die Biolumineszenz-Messungen wurden mit dem NightOWL LB 981 System (Berthold Technologies) oder bei der Firma Experimental Pharmacology and Oncology mit Hilfe des VisiLux Imagers (Visitron Systems) mit einer Belichtungszeit von 5 min aufgenommen. Die Messungen erfolgten 1-mal wöchentlich über einen Zeitraum von maximal sieben Wochen, wenn keine Kriterien zum Versuchsabbruch bestanden. Schließlich wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet; Milz und Leber wurden entnommen und die Organe wurden fotografiert. Für *ex vivo* Biolumineszenz-Messungen wurde ca. 100  $\mu$ l Luciferin auf die Organe gegeben und die Biolumineszenz mit einer Belichtungszeit von 20 s bis 1 min gemessen. Anschließend wurden Milz und Leber schockgefroren.

Die Software ImageJ Version 2.3 oder MetaMorph wurde für die Overlay-Bilder und für die Angabe der Signalintensitäten verwendet.

## 2.8 Statistik

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism Version 5 und PASW Statistics 18 durchgeführt. Die Korrelation von zwei Gruppen wurde mit einem zweiseitigen Student's t-test getestet. Die Signifikanzen von einer Kontrollgruppe zu mehreren Gruppen wurde mit der one-way analysis of variance (ANOVA) und dem Bonferroni post hoc Verfahren überprüft. Von den Daten wurde grafisch der Mittelwert mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt. Die Korrelationen von klinischen Parametern zu MACC1 SNPs wurden mittels Chi-Quadrat-Tests mit einem Freiheitsgrad von 1 getestet. Die Odds Ratios (OR) und die Hazard Ratios (HR) mit dem jeweiligen 95% Konfidenzintervallen (KI) wurden berechnet. Signifikanzen von Box Plots wurden mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Für die cut-off Werte der MACC1, S100P oder SPON2 Expression wurden die Mediane verwendet oder die cut-off Werte wurden mittels ROC-Analyse ermittelt. Kaplan-Meier Kurven wurden eingesetzt um Überlebenskurven darzustellen und Unterschiede wurde mittels Long-Rank Test auf Signifikanz untersucht. Eine statistische Signifikanz von  $p < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 MACC1 Mutationsanalyse in kolorektalen Tumoren

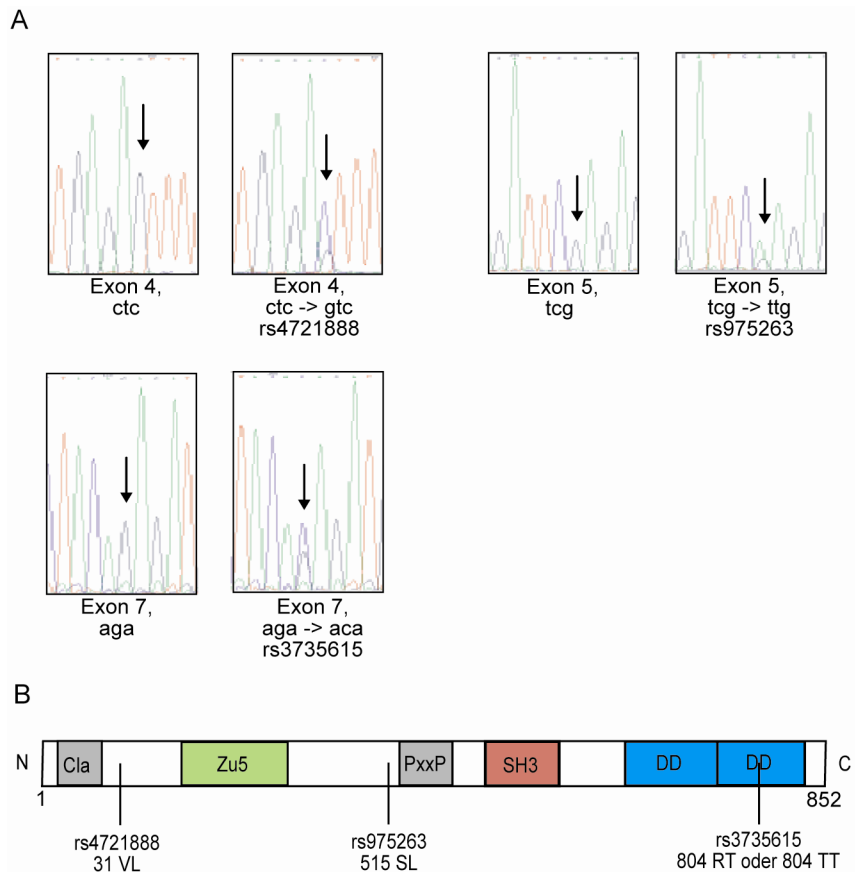
Humane kolorektale Tumore wurden auf Mutationen in den kodierenden Exons von MACC1 untersucht. Ein möglicher funktionaler Einfluss von identifizierten MACC1 SNPs wurde mittels Motilitäts- und Proliferationsstudien und mit Hilfe von klinischen Daten, wie z. B. metachroner Metastasierung oder Überleben der Patienten, geprüft.

##### 3.1.1 Identifizierte MACC1 SNPs und MET Varianten in kolorektalen Tumoren

Die genomische DNA von 60 kolorektalen Tumoren wurde isoliert. Anschließend wurden die kodierenden Exons vier bis sieben von MACC1 und die häufig mutierten Exons 14 bis 19 von MET sequenziert.

Wir identifizierten an drei Positionen in der MACC1 Sequenz einen Nukleotidaustausch (Abb. 3.1). Die identifizierten MACC1 SNPs wurden in einem weiteren Set von 94 kolorektalen Tumoren sequenziert und waren dort in der gleichen Häufigkeit wie im ersten Set zu finden. Im Exon vier war das Kodon ctc zu gtc (rs4721888) ausgetauscht, in Exon fünf war der tct- zum ttg-Genotyp (rs975263) konvertiert und Exon sieben wies einen aca-Genotyp (rs3735615) anstelle des aga-Genotyps auf (Abb. 3.1 A). Der gtc-Genotyp war in 13%, ttg in 48% und aca in 84% aller 154 Tumore zu finden. Tumore mit dem heterozygoten gtc-Genotyp trugen immer auch den heterozygoten ttg-Genotyp. Weiterhin besaßen 97% der Tumore mit dem ttg-Genotyp auch einen heterozygoten oder homozygoten aca-Genotyp. Die drei identifizierten MACC1 missense SNPs rs4721888, rs975263 und rs3735615 sind bereits in Datenbanken annotiert, aber ihr Vorkommen und ihre Bedeutung in kolorektalen Tumoren ist bisher unbekannt.

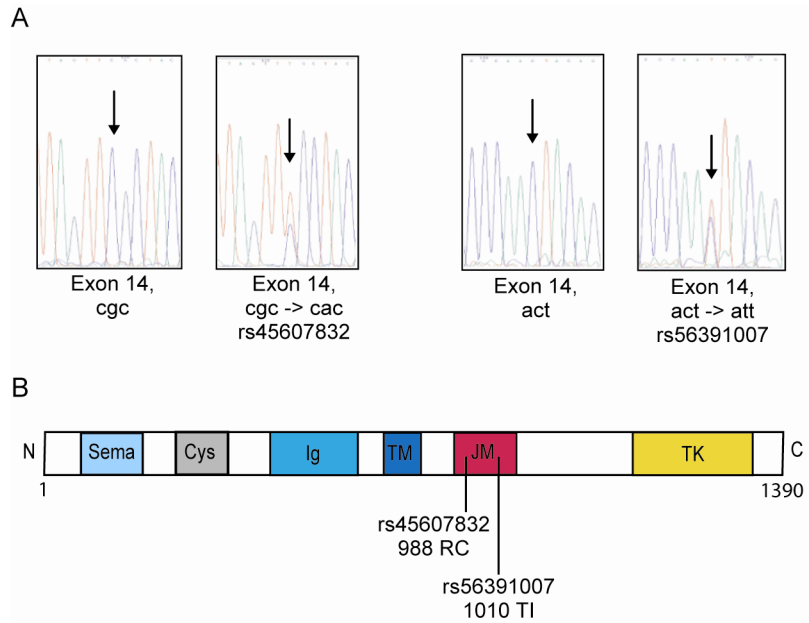
Der SNP rs4721888 ist in der MACC1 Proteinstruktur im N-terminalen Bereich lokalisiert. Die Variante 515 SL (rs4721888) befindet sich vor der prolinreichen Sequenz. Nur rs3735615 liegt in einer putativen Domäne im MACC1 Protein, der zweiten Death Domäne (Abb. 3.1 B). Mittels SIFT [152] und Polyphen [153] Software Programmen lässt sich der funktionale Effekt der SNPs auf das Protein einschätzen. Beide Programme sagten auf Grund der Lage in der Proteinsequenz voraus, dass die Varianten 31 VL (rs4721888) und 515 SL (rs975263) wahrscheinlich keinen funktionalen Einfluss haben, jedoch könnte 804 RT oder 804 TT in der konservierten Domäne einen Effekt auf die Funktionalität des Proteins besitzen.



**Abb. 3.1 Identifizierte MACC1 SNPs in der DNA-Sequenz von humanen kolorektalen Tumoren.**

A) Durch Sequenzierung wurde an drei Positionen ein Nukleotidaustausch in der MACC1 Sequenz festgestellt. Die Pfeile in den Chromatogrammen geben die Stellen in der DNA-Sequenz an. B) Die Lokalisation der MACC1 SNPs in der MACC1 Proteinstruktur ist dargestellt. Nur rs3735615 befindet sich in einer putativen Domäne (der Death Domäne) des MACC1 Proteins. Cla: Clathrin Box, Zu5: Zu5 Domäne, PXXP: Prolinreiches Motiv, SH3: Src Homology 3 Domäne, DD: Death Domäne.

Weiterhin untersuchten wir die genomische DNA, die für die Juxtamembran und die Kinase Domäne des MET Rezeptor kodiert. Dort wurden in zwei von 60 Tumoren die MET Varianten R988C (rs45607832) und T1010I (rs56391007) identifiziert (Abb. 3.2 A). Im Exon 14 ist der cgc-Genotyp zum cac-Genotyp (rs45607832) konvertiert und anstelle des act-Kodon befindet sich ein att-Kodon (rs56391007). Beide Varianten sind in der Juxtamembran Domäne des MET Rezeptors lokalisiert (Abb. 3.2 B). Da MET Varianten in den Tumoren selten vorkamen, wurden sie in einem zweiten Panel nicht weiter untersucht.

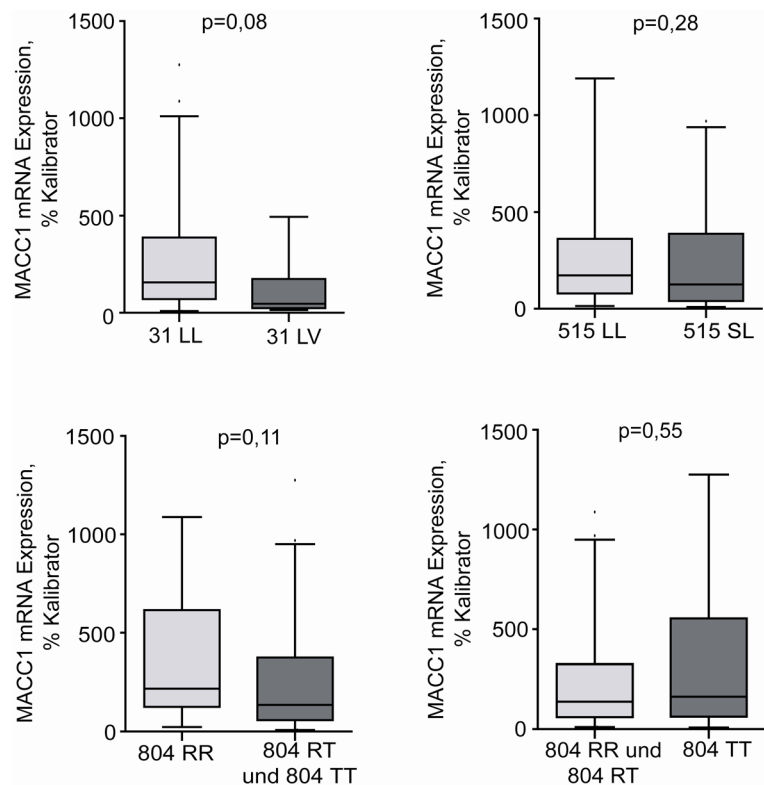


**Abb. 3.2 Identifizierte MET Varianten in der DNA-Sequenz von humanen kolorektalen Tumoren.**

A) Durch Sequenzierung wurden zwei MET Varianten in 60 Tumoren festgestellt. Die Pfeile in den Chromatogrammen zeigen diese Stellen in der DNA-Sequenz. B) Beide Varianten (rs45607832 und rs56391007) befinden sich in der Juxtamembran-Domäne des MET-Proteins. Sema: Sema Domäne, Cys: Cysteinreiche Domäne, Ig: Immunoglobulin Domäne, TM: Transmembran Domäne, JM: Juxtamembran Domäne, TK: Tyrosin Kinase Domäne.

### 3.1.2 MACC1 SNPs haben keinen Einfluss auf die MACC1 Expression

Es wurde zunächst analysiert, ob die drei MACC1 SNPs rs4721888, rs975263 und rs3735615 einen Effekt auf die MACC1 mRNA Expression in den 60 sequenzierten kolorektalen Tumoren haben. Dabei wurde die MACC1 Expression in den Tumoren mittels qRT-PCR bestimmt. Weder die MACC1 Variante 31 VL, noch 515 SL oder 804 RT bzw. 804 TT veränderten die MACC1 mRNA Expression in den Tumoren signifikant (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3 Einfluss der MACC1 SNPs auf die MACC1 mRNA Expression in humanen kolorektalen Tumoren.**

Die MACC1 mRNA Expression wurde in 60 kolorektalen Tumoren mittels qRT-PCR ermittelt. Die MACC1 Varianten 31 LV (rs4721888), 515 SL (rs975263), 804 RT oder 804 TT (rs3735615) hatten keinen Effekt auf die MACC1 mRNA Expression in den Tumoren.

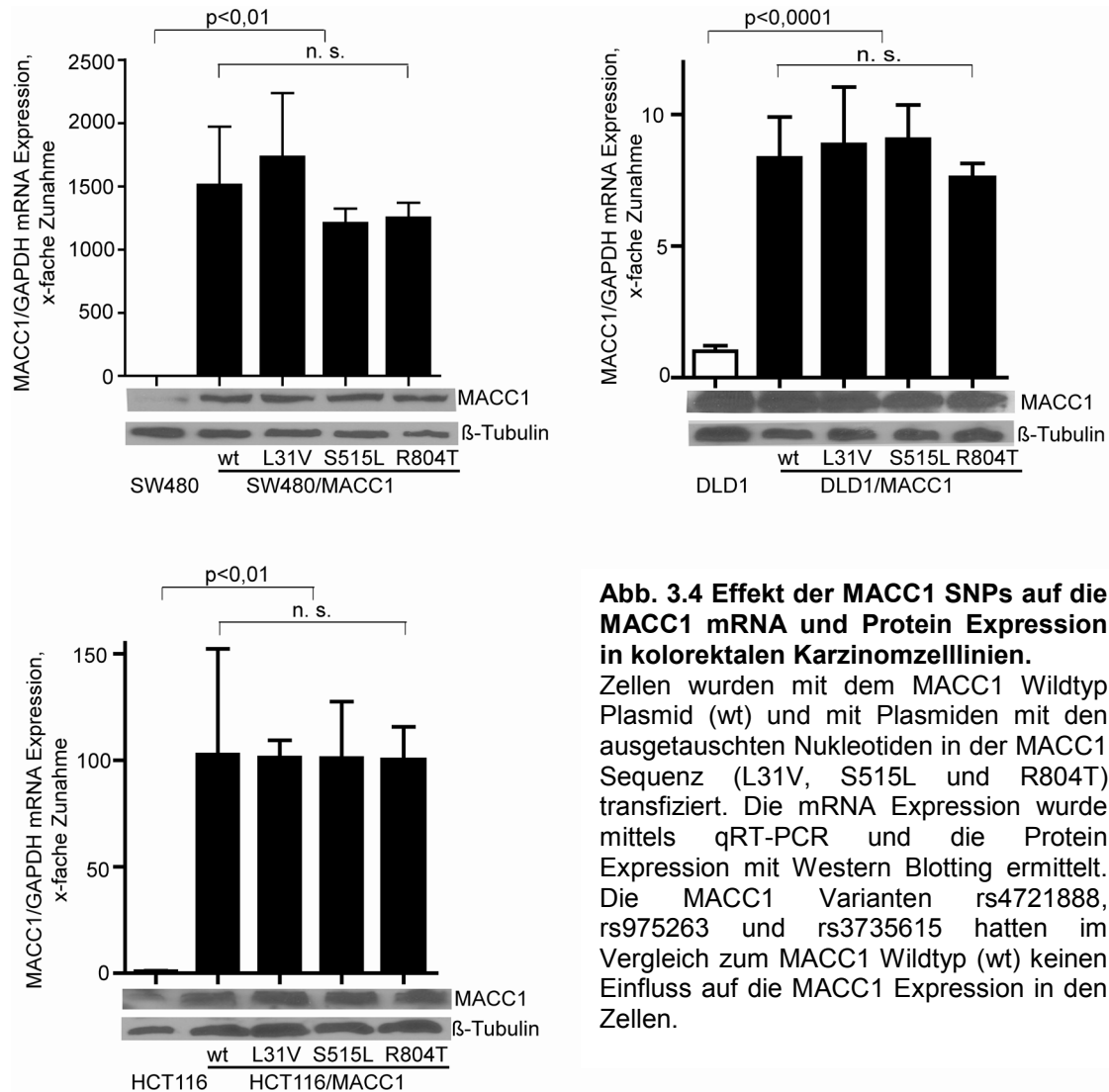
Weiterhin wurde geprüft, ob die MACC1 SNPs die MACC1 mRNA oder Protein Expression in kolorektalen Karzinomzelllinien beeinflussen. Die Zelllinie SW480 besitzt nahezu keine endogene, HCT116 nur eine geringe und DLD1 eine moderate MACC1 Expression.

Es wurden mittels site-directed mutagenesis Plasmide generiert, die die ausgetauschten Nukleotide in der MACC1 Sequenz enthielten. Das Wildtyp Plasmid (wt) beinhaltete die MACC1 Referenzsequenz. Im benannten L31V Plasmid wurde das c-Allel zum g-Allel (rs4721888) ausgetauscht. Im S515L Plasmid wurde an der Position von S515L das c-Allel zum t-Allel (rs975263) konvertiert und im R804T Plasmid war an der Stelle von R804T das g-Allel zum c-Allel (rs3735615) verändert.

Im Folgenden wurden die humanen kolorektalen Karzinomzelllinien SW480, DLD1 und HCT116 mit den generierten Konstrukten transfiziert. Mittels qRT-PCR und Western Blottings wurde die MACC1 Expression in den Wildtyp Zelllinien und in den Transfektanten bestimmt. Alle Transfektanten wiesen eine höhere MACC1 Expression im Vergleich zur parentalen Zelllinie auf ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,0001$  und  $p < 0,01$ ). Dennoch



hatte keiner der MACC1 SNPs einen Einfluss auf die MACC1 mRNA oder Protein Expression in diesen Zellen (Abb. 3.4).



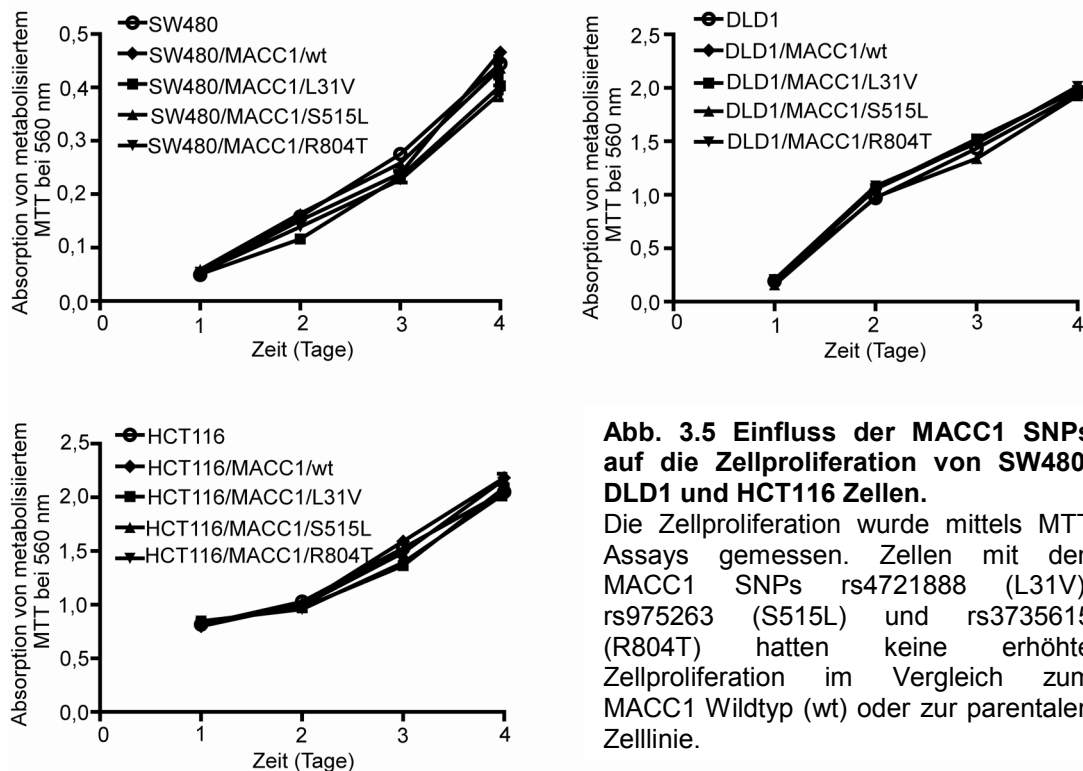
**Abb. 3.4 Effekt der MACC1 SNPs auf die MACC1 mRNA und Protein Expression in kolorektalen Karzinomzelllinien.**

Zellen wurden mit dem MACC1 Wildtyp Plasmid (wt) und mit Plasmiden mit den ausgetauschten Nukleotiden in der MACC1 Sequenz (L31V, S515L und R804T) transfiziert. Die mRNA Expression wurde mittels qRT-PCR und die Protein Expression mit Western Blotting ermittelt. Die MACC1 Varianten rs4721888, rs975263 und rs3735615 hatten im Vergleich zum MACC1 Wildtyp (wt) keinen Einfluss auf die MACC1 Expression in den Zellen.

### 3.1.3 MACC1 SNPs haben keinen Effekt auf die Zellproliferation

Zudem wurde analysiert, ob die MACC1 SNPs einen Einfluss auf die Fähigkeit der kolorektalen Karzinomzellen zur Proliferation haben. Die Zellproliferation der Zelllinien SW480, DLD1 und HCT116 und deren Transfektanten wurde mittels MTT-Assays bestimmt.

Die Proliferationsrate der Transfektanten mit den MACC1 Varianten rs4721888, rs975263 und rs3735615 war vergleichbar zu der Proliferationsrate der MACC1 Wildtyp Zellen und zur jeweiligen parentalen Zelllinie. Folglich beeinflussten die MACC1 SNPs die Zellproliferation dieser kolorektalen Zelllinien nicht.

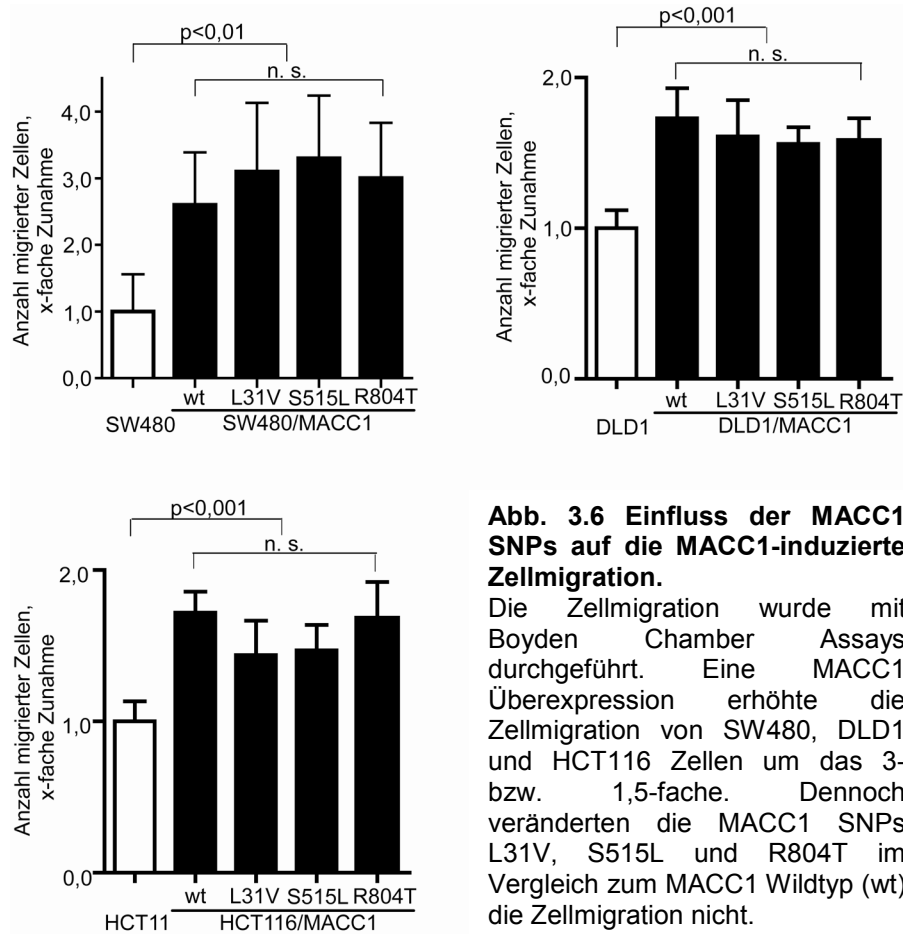


**Abb. 3.5 Einfluss der MACC1 SNPs auf die Zellproliferation von SW480, DLD1 und HCT116 Zellen.**

Die Zellproliferation wurde mittels MTT Assays gemessen. Zellen mit den MACC1 SNPs rs4721888 (L31V), rs975263 (S515L) und rs3735615 (R804T) hatten keine erhöhte Zellproliferation im Vergleich zum MACC1 Wildtyp (wt) oder zur parentalen Zelllinie.

#### 3.1.4 MACC1 SNPs beeinflussen nicht die Zellmigration

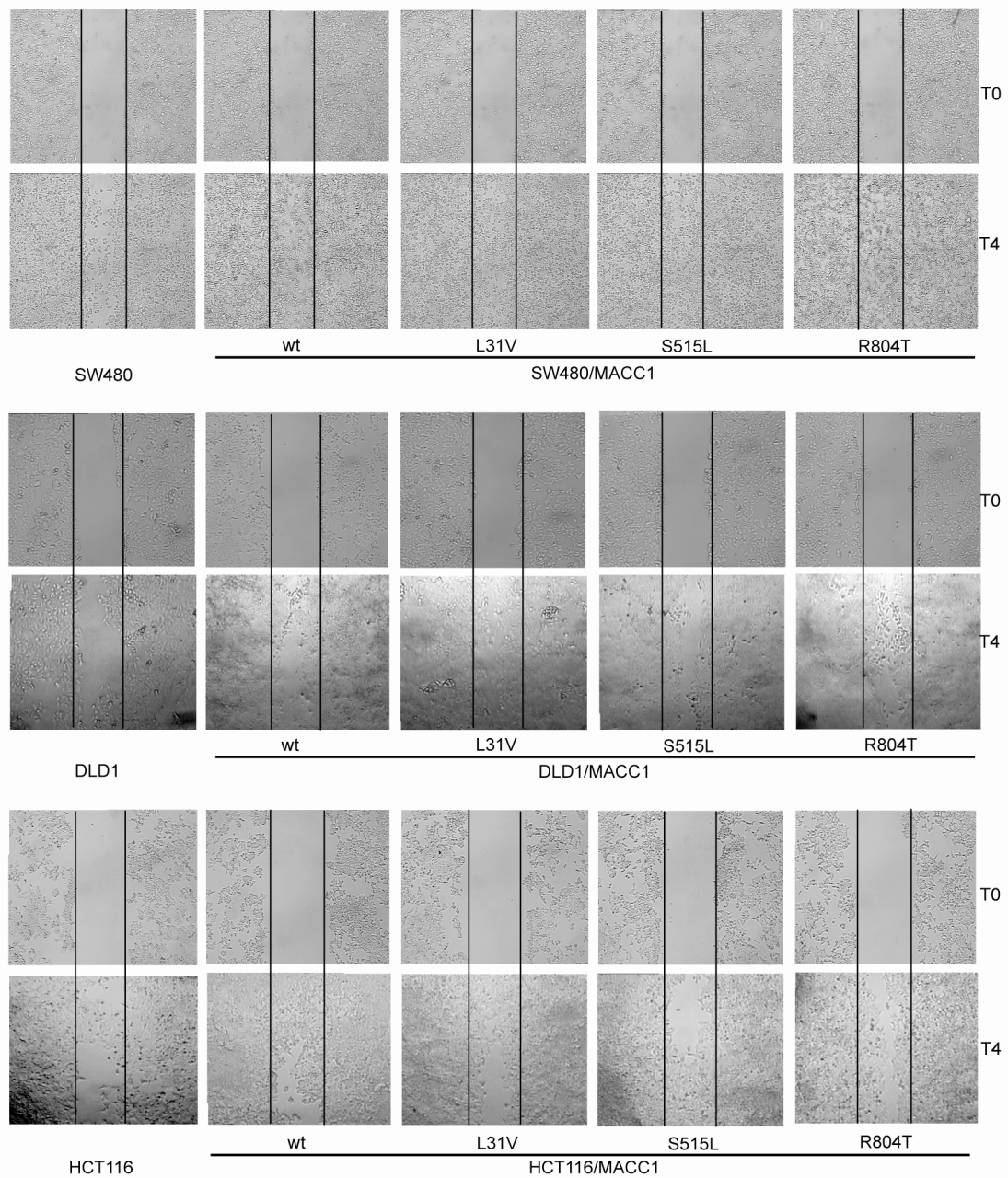
Um einen möglichen Einfluss der MACC1 SNPs auf die Motilität von kolorektalen Karzinomzelllinien zu testen, wurden *in vitro* Zellmigrationsassays mittels Boyden Chambers durchgeführt. Die parentale Zelllinie SW480 wies nur eine sehr geringe, DLD1 und HCT116 eine moderate Fähigkeit zur Zellmigration auf. MACC1 induzierte in allen drei kolorektalen Zelllinien eine erhöhte Zellmigration. Bereits Stein et al. beschrieben, dass MACC1 überexprimierende SW480 Zellen eine 5-fach erhöhte Zellmigration haben [86]. In dieser Studie war die Zellmigration in MACC1 überprimierenden SW480 Zellen 3-fach ( $p < 0,01$ ) und in DLD1 bzw. HCT116 um 1,5-fach erhöht ( $p < 0,001$ ). Dennoch veränderten die MACC1 SNPs rs4721888 (L31V), rs975263 (S515L) und rs3735615 (R804T) die MACC1-induzierte Migration in SW480, DLD1 oder HCT116 Zellen nicht (Abb. 3.6).



### 3.1.5 MACC1 SNPs haben keinen Einfluss auf die gerichtete Zellmigration

Zudem wurde überprüft, ob die MACC1 SNPs rs4721888 (L31V), rs975263 (S515L) oder rs3735615 (R804T) die gerichtete Zellmigration von SW480, DLD1 und HCT116 Zellen variieren. Dafür wurde ein Wundheilungsassay durchgeführt. Zellen wurden ausgesät und eine Wunde mit definierter Breite wurde in den Zellrasen hinzugefügt, die bis zum Tag vier dokumentiert wurde.

Durch frühere Studien war bereits bekannt, dass SW480 Zellen mit einer MACC1 Überexpression in der Lage sind die Wunde schneller zu schließen [86]. Auch in dieser Studie beschleunigten die MACC1 Transfektanten im Vergleich zu den parentalen Zelllinien die Wundheilung. Dennoch zeigten die MACC1 SNPs wiederum keinen Einfluss auf diese gerichtete Zellmigration (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7 MACC1 SNPs veränderten die gerichtete Migration von kolorektalen Karzinomzelllinien nicht.**

Die gerichtete Migration wurde mittels Wundheilungsassays bestimmt und mit 10-facher Vergrößerung mit einem Leica Lichtmikroskop fotografiert. Zellen mit einer MACC1 Überexpression (wt, L31V, S515L und R804T) waren fähig die Wunde im Zellrasen schneller zu schließen. Die MACC1 SNPs (L31V, S515L und R804T) veränderten diese Fähigkeit jedoch nicht. T0: Tag null, T4: Tag vier.

### 3.1.6 MACC1 SNPs sind nicht mit klinischen Parametern assoziiert

Die klinischen Parameter der 154 Patienten mit kolorektalem Karzinom, wie z. B. das Geschlecht oder Alter der Patienten, aber auch metachrone Metastasierung, Tumordinfiltrationstiefe, Lymphknotenstatus oder UICC-Stadien wurden mittels Chi-Quadrat-Berechnungen auf Assoziation mit den MACC1 SNPs geprüft (Tab. 1). Keiner der SNPs war assoziiert mit dem Alter, dem Geschlecht der Patienten oder weiteren klinischen Parametern, wie der Tumordinfiltrationstiefe oder den Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. Die SNPs waren ebenfalls nicht mit den UICC-Stadium I, II oder III assoziiert (Stadium IV wurde nicht untersucht). Zudem hatten sie keinen Einfluss auf die metachrone Metastasierung.

Tab. 1: MACC1 SNPs sind nicht assoziiert mit klinischen Parametern

rs4721888 (L31V)		Genotyp		P-Wert	OR	95% KI
Parameter	Leu/Leu (ctc/ctc) (%)	Leu/Val (ctc/gtc) (%)				
Alle Tumore, n=154	134 (87%)	20 (13%)				
Geschlecht, männlich, n=79	68 (86%)	11 (14%)	0,72	1,19	0,46 - 3,05	
Alter > 66,32 Jahre (Median), n=77	67 (87%)	10 (13%)	1,00	1,00	0,39 - 2,56	
Mit metachroner Metastasierung, n=29	27 (93%)	2 (7%)	0,28	0,44	0,10 - 2,02	
Tumordinfiltrationstiefe T3 oder T4, n=118	102 (86%)	16 (14%)	0,70	1,26	0,39 - 4,03	
Lymphknotenstatus N1 bis N3, n=53	43 (81%)	10 (19%)	0,12	2,12	0,82 - 5,47	
UICC -Stadium I, n=26	24 (92%)	2 (8%)	0,38	0,51	0,11 - 2,34	
UICC-Stadium II, n=74	66 (89%)	8 (11%)	0,44	0,69	0,26 - 1,79	
UICC-Stadium III, n=54	44 (81%)	10 (19%)	0,13	2,05	0,79 - 5,28	

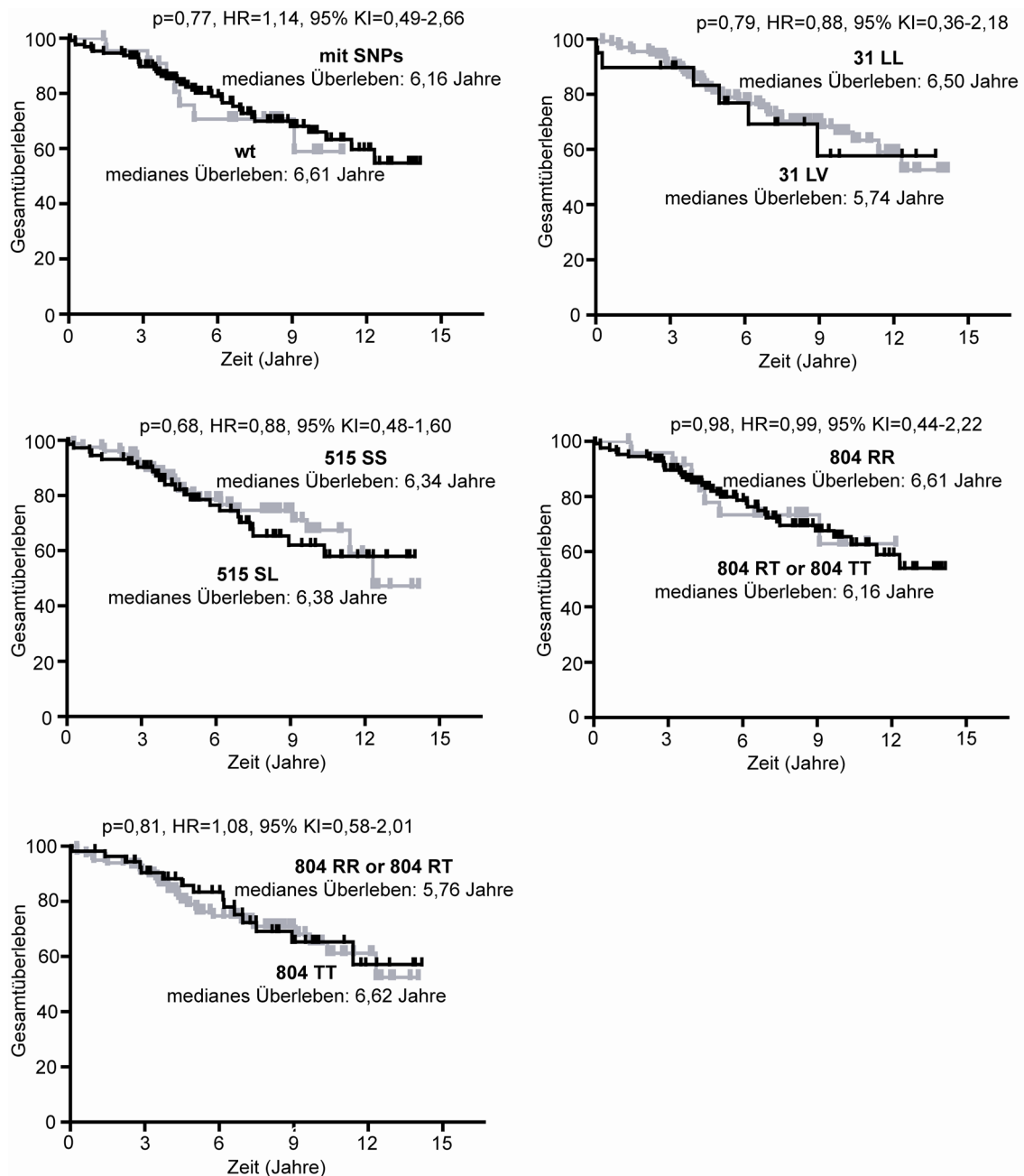
rs975263 (S515L)		Genotyp		P-Wert	OR	95% KI
Parameter	Ser/Ser (tcg/tcg) (%)	Ser/Leu (tcg/ttg) (%)				
Alle Tumore, n=154	80 (52%)	74 (48%)				
Geschlecht, männlich, n=79	40 (51%)	39 (49%)	0,74	1,11	0,59 - 2,10	
Alter > 66,32 Jahre (Median), n=77	40 (52%)	37 (48%)	1,00	1,00	0,53 - 1,88	
Mit metachroner Metastasierung, n=29	12 (41%)	17 (59%)	0,21	1,69	0,75 - 3,83	
Tumordinfiltrationstiefe T3 oder T4, n=118	63 (53%)	55 (47%)	0,52	0,78	0,37 - 1,65	
Lymphknotenstatus N1 bis N3, n=53	26 (49%)	27 (51%)	0,60	1,19	0,61 - 2,32	
UICC -Stadium I, n=26	14 (54%)	12 (46%)	0,83	0,91	0,39 - 2,13	
UICC-Stadium II, n=74	39 (53%)	35 (47%)	0,86	0,94	0,50 - 1,78	
UICC-Stadium III, n=54	27 (50%)	27 (50%)	0,72	1,13	0,58 - 2,19	

rs3735615 (R804T)		Genotyp		Vergleich 804 RR zu 804 RT/TT		
Parameter	Arg/Arg (aga/aga) (%)	Arg/Thr (aga/aca) (%)	Thr/Thr (aca/aca) (%)	P-Wert	OR	95% KI
Alle Tumore, n=154	25 (16%)	74 (48%)	55 (36%)			
Geschlecht, männlich, n=79	11 (14%)	37 (47%)	31 (39%)	0,43	1,42	0,60 - 3,36
Alter > 66,32 Jahre (Median), n=77	12 (16%)	39 (51%)	26 (34%)	0,83	1,10	0,47 - 2,59
Mit metachroner Metastasierung, n=29	5 (17%)	15 (52%)	9 (31%)	0,95	0,96	0,33 - 2,80
Tumordinfiltrationstiefe T3 oder T4, n=118	21 (18%)	53 (45%)	44 (37%)	0,34	0,58	0,18 - 1,81
Lymphknotenstatus N1 bis N3, n=53	9 (17%)	27 (51%)	17 (32%)	0,86	0,92	0,38 - 2,25
UICC -Stadium I, n=26	4 (15%)	14 (54%)	8 (31%)	0,90	1,08	0,34 - 3,46
UICC-Stadium II, n=74	12 (16%)	32 (43%)	30 (41%)	1,00	1,00	0,43 - 2,36
UICC-Stadium III, n=54	9 (17%)	28 (52%)	17 (32%)	0,91	0,95	0,39 - 2,33

Die klinischen Parameter wurden anhand des Chi-Quadrat-Tests mit einem Freiheitsgrad von 1 auf Assoziation mit MACC1 SNPs geprüft. Zu den Werten sind die Odd Ratios (OR) mit den dazugehörigen 95% Konfidenzintervallen (KI) angegeben. Leu: Leucin, Val: Valin, Ser: Serin, Arg: Arginin, Thr: Threonin.

### 3.1.7 MACC1 SNPs sind nicht mit dem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert

Weiterhin wurde analysiert, ob die MACC1 Varianten mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert sind. Zunächst wurde ermittelt, ob sie einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der 154 Patienten mit kolorektalem Karzinom haben (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8 MACC1 SNPs waren nicht mit dem Gesamtüberleben aller 154 Patienten mit kolorektalen Karzinom assoziiert.**

Keiner der SNPs war signifikant mit dem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert. Die Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben basierend auf den MACC1 SNPs dar. Die p-Werte wurden mittels log-rank Test bestimmt. Die Hazard Ratios (HR) mit den dazugehörigen 95% Konfidenzintervallen (KI) sind angegeben.

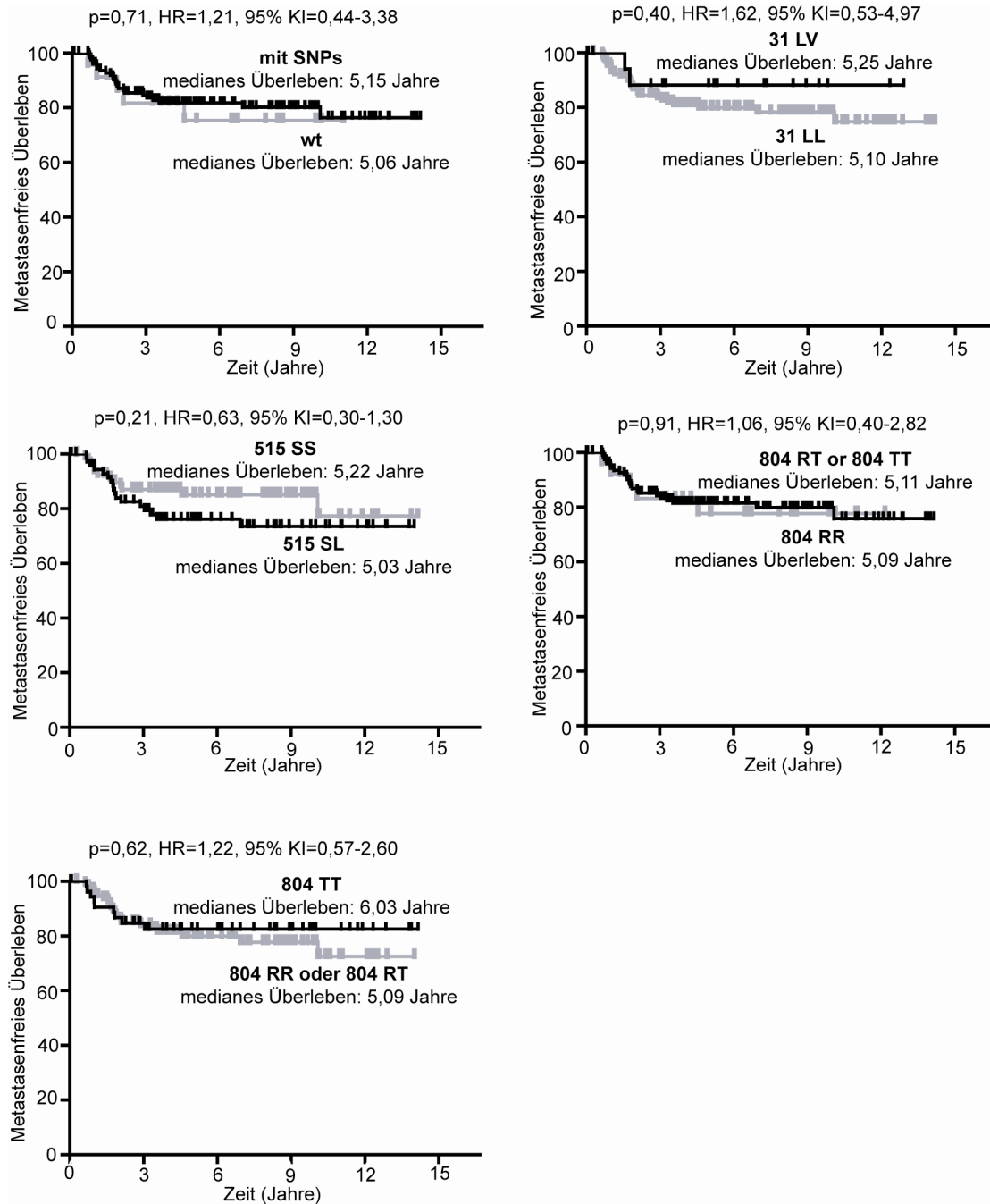
Dabei hatten weder Patienten mit allen SNPs ( $p=0,77$ ,  $HR=1,14$ , 95%  $KI=0,49-2,66$ ) noch Patienten mit der Variante 31 VL ( $p=0,79$ ,  $HR=0,88$ , 95%  $KI=0,36-2,18$ ), 515 SL ( $p=0,68$ ,  $HR=0,88$ , 95%  $KI=0,48-1,60$ ), 804 RT ( $p=0,98$ ,  $HR=0,99$ , 95%  $KI=0,44-2,22$ ) oder der homozygoten Variante 804 TT ( $p=0,81$ ,  $HR=1,08$ , 95%  $KI=0,58-2,01$ ) eine kürzeres Gesamtüberleben (Abb. 3.8). Die medianen Überlebenszeiten in allen vergleichenden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant.

### 3.1.8 MACC1 SNPs sind nicht assoziiert mit dem metastasenfreien Überleben der Patienten

Zudem wurde geprüft, ob die SNPs mit dem metastasenfreien Überleben aller 154 Patienten mit kolorektalem Karzinom assoziiert sind (Abb. 3.9).

Auch hier zeigte sich, dass weder die Patienten mit allen SNPs ( $p=0,71$ ,  $HR=1,21$ , 95%  $KI=0,44-3,38$ ), noch die Patienten mit SNP 31 VL ( $p=0,40$ ,  $HR=1,62$ , 95%  $KI=0,53-4,97$ ), SNP 515 SL ( $p=0,21$ ,  $HR=0,63$ , 95%  $KI=0,30-1,30$ ), SNP 804 RT ( $p=0,91$ ,  $HR=1,06$ , 95%  $KI=0,40-2,82$ ) oder 804 TT ( $p=0,62$ ,  $HR=1,22$ , 95%  $KI=0,57-2,60$ ) ein verändertes metastasenfreies Überleben hatten.



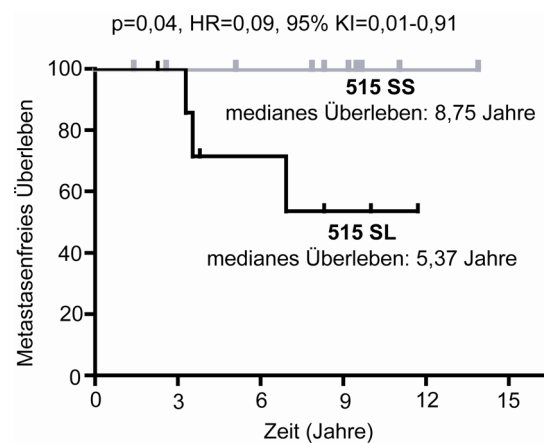


**Abb. 3.9 MACC1 SNPs waren nicht mit dem metastasenfreien Überleben aller 154 Patienten mit kolorektalen Karzinom assoziiert.**

Keiner der SNPs war signifikant mit dem metastasenfreien Überleben der Patienten assoziiert. Die Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben basierend auf den MACC1 SNPs dar. Die p-Werte wurden mittels log-rank Tests bestimmt und die Hazard Ratios (HR) mit den dazugehörigen 95% Konfidenzintervallen (KI) sind angegeben.

### 3.1.9 Jüngere Kolonkarzinompatienten in frühen Stadien mit MACC1 SNP 515 SL haben ein signifikant verkürztes metastasenfreies Überleben

Schließlich analysierten wir die Überlebenszeit von Patienten in einer Subgruppe der 154 Patienten. Kolonkarzinompatienten unter 60 Jahre (Alter bei Diagnose), in UICC-Stadium I oder II (n=18) mit MACC1 Variante 515 SL hatten ein kürzeres metastasenfreies Überleben ( $p=0,04$ ,  $HR=0,09$ ,  $95\% \text{ KI}=0,01-0,91$ ). Patienten dieser Gruppe mit der MACC1 Variante 515 SL hatten eine mediane metastasenfreie Überlebenszeit von 5,37 Jahre im Vergleich zu Patienten mit der Variante 515 SS, die eine mediane metastasenfreie Überlebenszeit von 8,75 Jahren besaßen.



**Abb. 3.10 Der MACC1 SNP 515 SL war signifikant mit einem kürzeren metastasenfreien Überleben von jüngeren Kolonkarzinompatienten in frühen UICC-Stadien assoziiert.**

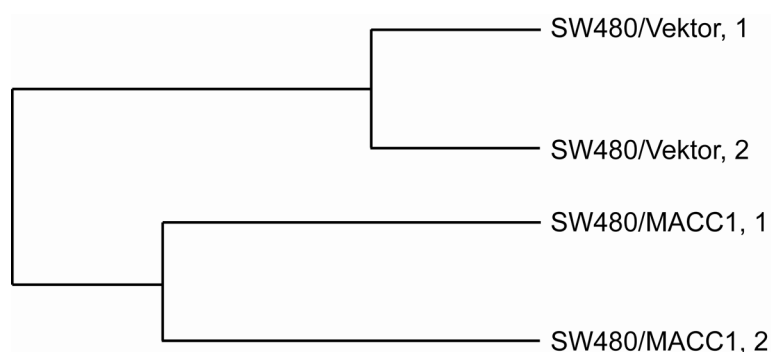
Patienten mit Kolonkarzinom, die jünger als 60 Jahre alt sind und in das UICC-Stadium I oder II eingestuft wurden, hatten ein signifikant kürzeres metastasenfreies Überleben, wenn sie den MACC1 SNP 515 SL trugen ( $p=0,042$ ,  $HR=0,09$ ,  $KI=0,01-0,91$ ). Die Kaplan-Meier-Kurve für diese Subgruppe (n=18) wird gezeigt. Der p-Wert wurde mittels log-rank Tests bestimmt. Die Hazard Ratios (HR) mit den dazugehörigen 95% Konfidenzintervallen (KI) sind ermittelt worden.

### 3.2 Identifizierung von neuen transkriptionellen MACC1 Targetgenen und deren Einfluss auf die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms

Im Zuge dieser Arbeit wurden transkriptionelle Targetgene von MACC1 mittels Microarray-Technologie identifiziert. Es wurde mit Hilfe von Motilitätsassays mit kolorektalen Karzinomzellen, sowie mit Xenograft Modellen und humanen kolorektalen Tumoren geprüft, ob die Expression der Targetgene S100P und SPON2 einen Einfluss auf die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms haben könnte.

#### 3.2.1 Identifizierung von transkriptionellen MACC1 Targetgenen mittels Microarray Analyse

Für die genomweite Analyse wurde die Zelllinie SW480 mit ihrer endogen sehr niedrigen MACC1 Expression verwendet. Dabei wurde die Genexpression eines Kontrollklons mit stabil transfiziertem Leervektor (SW480/Vektor) mit einem stabil überexprimierenden MACC1 Klon der gleichen Zelllinie (SW480/MACC1) verglichen. Die Microarrays wurden in Duplikaten mit jeweils einer unterschiedlichen Passagenzahl der Zellen durchgeführt. Die Genexpressionen der Duplikate der Kontrollen (SW480/Vektor, 1 und SW480/Vektor, 2), sowie der Duplikate der MACC1 überexprimierenden Zellen (SW480/MACC1, 1 und SW480/MACC1, 2) hatten eine gute Vergleichbarkeit (Abb. 3.11). Dabei unterschied sich die genomweite Genexpression der MACC1-Klone etwas mehr voneinander als die der Kontrollklone. Unterschiede in der Genexpression sind durch die biologische Variation der unterschiedlichen Zellpassagen zu erklären.



**Abb. 3.11 Vergleichbarkeit der Microarray Duplikate.**

Für die genomweite Genexpressionsanalyse wurden biologische Duplikate verwendet. Die Genexpression der Kontrollen (SW480/Vektor, 1 und SW480/Vektor, 2), als auch die der SW480/MACC1 Zellen (SW480/MACC1, 1 und SW480/MACC1, 2) waren gut miteinander vergleichbar. Das Dendrogramm stellt graphisch dar, dass sowohl die Genexpression der beiden Kontrollklone SW480/Vektor, als auch die der SW480/MACC1 Klone geclustert ist. Die Kontrollklone sind sich in der Genexpression etwas ähnlicher als die MACC1-Klone.

Von den mehr als 41.000 Genen und Transkripten auf dem 4x44 K Whole Human Genome Microarray (Agilent Technologies) waren über 1.300 Gene in dem SW480/MACC1 Klon differentiell reguliert. Diese differentiell regulierten Gene wurden mit Hilfe des Functional Annotation Tools des DAVID Bioinformatics Resources 6.7 Programms in biologische Prozesse (Gene Ontology, Biological Process FAT) und KEGG Pathways eingeteilt [150, 151]. Die wichtigsten biologischen Prozesse aller differentiell regulierten Gene im Zellklon SW480/MACC1 sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tab. 2: Differentiell regulierte Gene im SW480/MACC1 Klon spielen u. a. für die bei der Krebsentstehung entscheidenden biologischen Prozesse eine Rolle.**















Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of cell development</a>	RT		34	0,4	3,5E-8	1,1E-4
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of neuron differentiation</a>	RT		23	0,2	4,2E-6	6,7E-3
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">positive regulation of developmental process</a>	RT		35	0,4	1,4E-5	1,5E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of nervous system development</a>	RT		27	0,3	2,5E-5	2,0E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of cell motion</a>	RT		27	0,3	2,7E-5	1,7E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">vasculature development</a>	RT		32	0,3	2,8E-5	1,5E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">blood vessel development</a>	RT		31	0,3	4,3E-5	2,0E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">blood vessel morphogenesis</a>	RT		28	0,3	4,8E-5	1,9E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of neurogenesis</a>	RT		24	0,2	5,0E-5	1,8E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of cell proliferation</a>	RT		70	0,7	1,1E-4	3,6E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of cell morphogenesis</a>	RT		20	0,2	1,2E-4	3,4E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of cell migration</a>	RT		23	0,2	1,8E-4	4,8E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of cell morphogenesis involved in differentiation</a>	RT		14	0,1	3,1E-4	7,4E-2
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">gland development</a>	RT		19	0,2	5,1E-4	1,1E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">biological adhesion</a>	RT		61	0,6	6,0E-4	1,2E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">defense response</a>	RT		55	0,6	6,3E-4	1,2E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">locomotory behavior</a>	RT		30	0,3	7,1E-4	1,3E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">axon guidance</a>	RT		16	0,2	8,7E-4	1,4E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">behavior</a>	RT		44	0,5	9,4E-4	1,5E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell adhesion</a>	RT		60	0,6	9,7E-4	1,4E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell-cell signaling</a>	RT		53	0,5	1,1E-3	1,5E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of locomotion</a>	RT		23	0,2	1,1E-3	1,5E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of system process</a>	RT		32	0,3	1,2E-3	1,5E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">positive regulation of multicellular organismal process</a>	RT		27	0,3	1,2E-3	1,5E-1
GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell motion</a>	RT		44	0,5	1,2E-3	1,4E-1

Diese regulierten Gene spielen u. a. eine Rolle in der Entwicklung (z. B. des Nervensystems oder der Blutgefäße), aber auch in der Zellmotilität, Zellproliferation, Zelladhäsion und der Zell-Zell-Signaltransduktion. Es können somit viele biologische Prozesse gefunden werden, die in der Tumورprogression und der Metastasierung eine

entscheidende Rolle spielen. Dies ist ein Indiz dafür, dass auch die nachgeschalteten Targetgene von MACC1 zum metastatischen Phänotyp beitragen könnten.

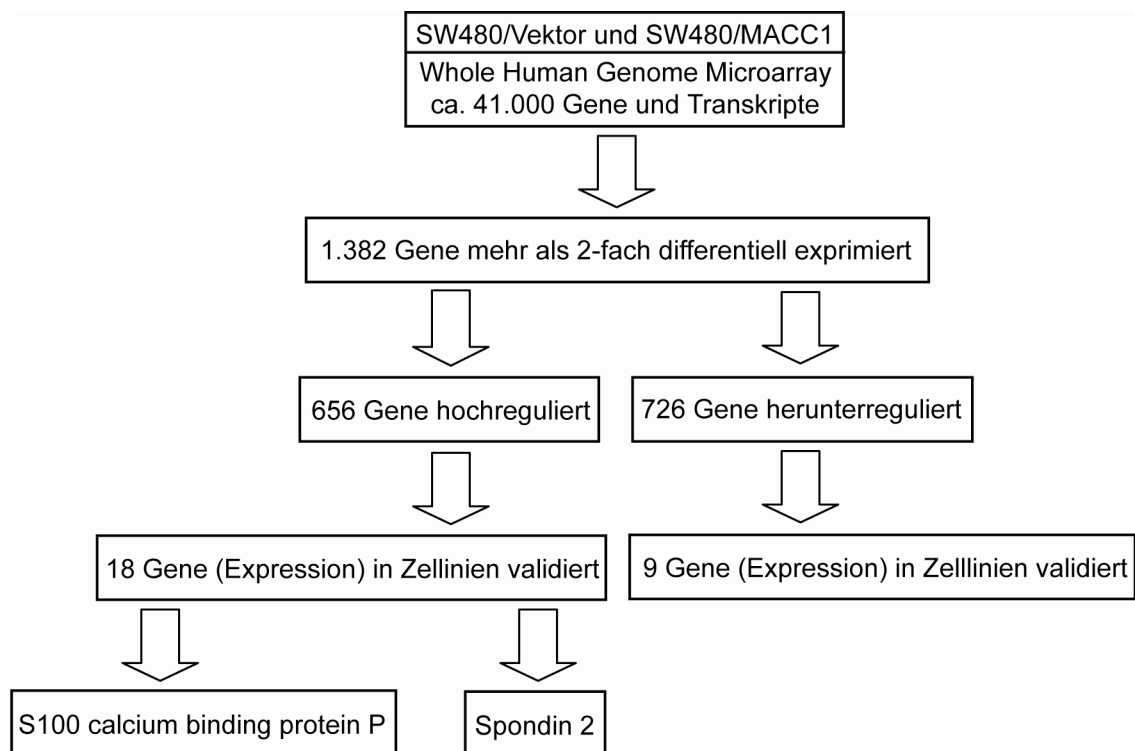
Zudem wurden die differentiell regulierten Gene des SW480/MACC1 Klon in Pathways kategorisiert (Tab. 3). Die KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathways zeigten, dass die Gene in ECM (extracellular matrix)-Rezeptor Interaktionen involviert sind. Diese Gene sind für die indirekte Kontrolle der zellulären Aktivität, wie der Zelladhäsion, Migration, Differenzierung, Proliferation und Apoptose verantwortlich [154]. Zudem sind viele differentiell regulierte Gene im MAPK Pathway zu finden. Es wurde bereits gezeigt, dass MACC1 im MAPK Pathway involviert ist [86]. Weiterhin sind Pathways, die in der Krebsentstehung eine Bedeutung haben im SW480/MACC1 Klon aktiviert. Eine Rolle von MACC1 in der Tumorentwicklung und Tumorprogression ist aus diesen Pathway Analysen erkennbar.

**Tab. 3 Differentiell regulierte Gene im SW480/MACC1 Klon sind in KEGG-Pathways, wie z. B. dem MAPK Pathway, kategorisiert.**

Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
KEGG_PATHWAY	<a href="#">ECM-receptor interaction</a>	RT		14	0,1	1,0E-3	1,5E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Systemic lupus erythematosus</a>	RT		13	0,1	1,2E-2	6,2E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">MAPK signaling pathway</a>	RT		26	0,3	1,2E-2	4,7E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">p53 signaling pathway</a>	RT		10	0,1	1,6E-2	4,8E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Axon guidance</a>	RT		15	0,2	1,8E-2	4,3E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Focal adhesion</a>	RT		20	0,2	2,5E-2	4,8E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Arginine and proline metabolism</a>	RT		8	0,1	3,3E-2	5,3E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">PPAR signaling pathway</a>	RT		9	0,1	4,6E-2	6,1E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Steroid hormone biosynthesis</a>	RT		7	0,1	4,9E-2	5,9E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</a>	RT		8	0,1	5,9E-2	6,2E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Regulation of actin cytoskeleton</a>	RT		19	0,2	7,6E-2	6,8E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Adherens junction</a>	RT		9	0,1	7,9E-2	6,6E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Calcium signaling pathway</a>	RT		16	0,2	8,9E-2	6,8E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Pathways in cancer</a>	RT		26	0,3	9,9E-2	7,0E-1

Von den über 1.300 differentiell regulierten Genen waren 656 Gene mehr als 2-fach hochreguliert und 726 Gene über 2-fach herunterreguliert (Abb. 3.12). Die Expression von 18 interessanten hochregulierten Genen und die von neun herunterregulierten Genen wurde in Zelllinienmodellen mittels qRT-PCR validiert. Hierfür wurde zum einen die für den Microarray verwendeten Zellklone SW480/Vektor und SW480/MACC1 verwendet. Zusätzlich wurde aber auch die Genexpression dieser Gene in der Zelllinie SW620 (SW620/Vektor) mit ihrer endogen hohen MACC1 Expression, sowie in SW620-Zellen mit verminderter MACC1 Expression

(SW620/MACC1shRNA) analysiert. Schließlich wurden für weiterführende Studien interessante Gene ausgewählt, die im MACC1-Klon mindestens 4-fach hochreguliert waren und einen kleinen p-Wert ( $p < 0,02$ ) in der Microarray Analyse hatten. Mit den Genen S100P (S100 calcium binding protein P) und SPON2 (Spondin 2) wurde im Folgenden weitergearbeitet. S100P ist ein schon bekanntes Metastasierungs-induzierendes Gen, während hingegen SPON2 im Zusammenhang mit Metastasierung noch nicht beschrieben wurde.



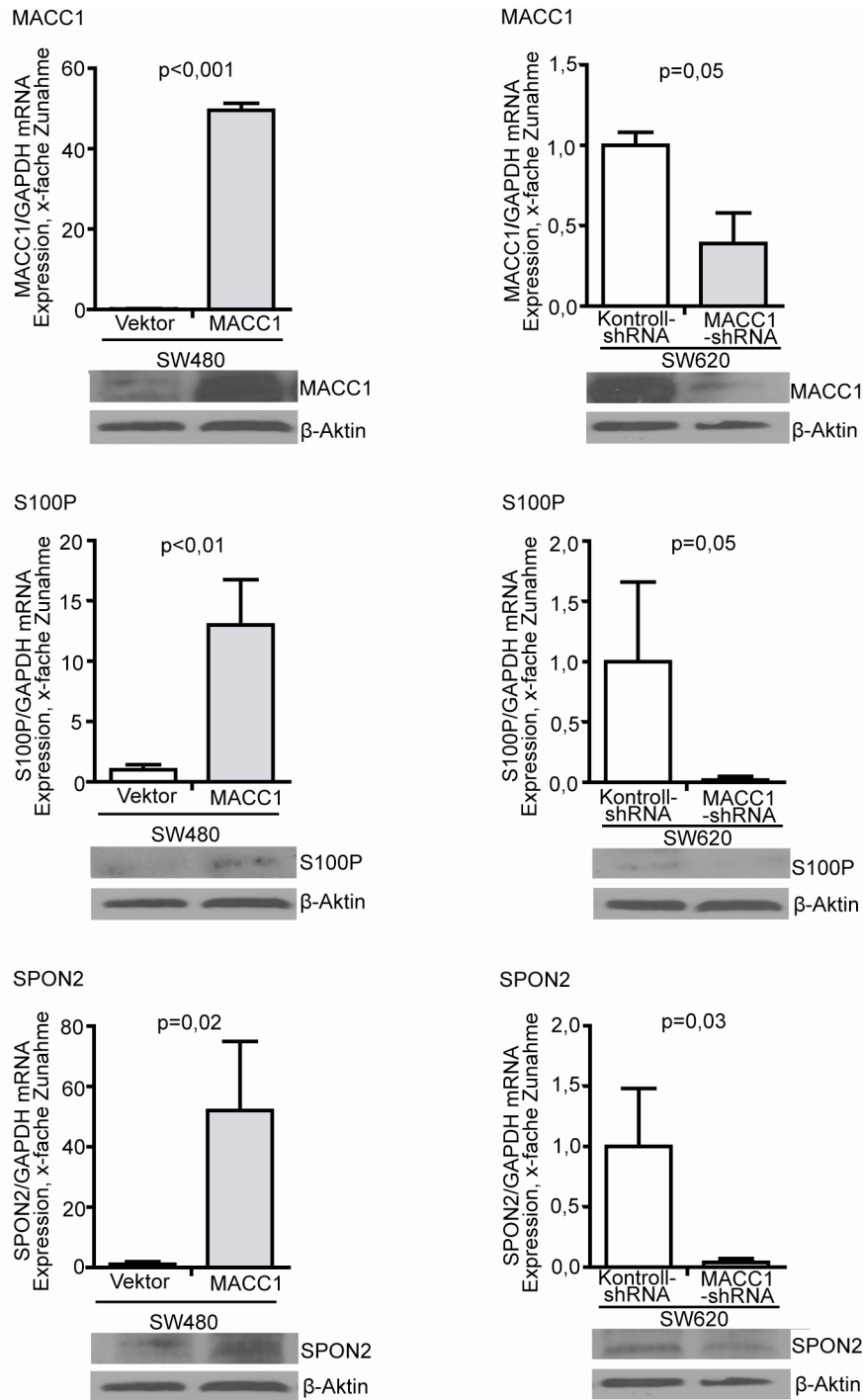
**Abb. 3.12 Auswahl der Gene für weitere Studien.**

Es befanden sich für mehr als 41.000 Gene und Transkripte Oligonukleotide auf dem 4x44 K Whole Human Microarray (Agilent Technologies). Die Genexpression des SW480/Vektor Klons wurde mit der des SW480/MACC1 Klons verglichen. Mehr als 1.300 Gene waren im SW480/MACC1 Klon differentiell reguliert. Von den 656 hochregulierten und 726 herunterregulierten Genen wurden Gene für die Validierung ausgewählt. Die Expression von jeweils 18 herunterregulierten und neun hochregulierten Genen wurde in den Zelllinien SW480, SW620 und Zellklonen validiert. Für weitere Studien wurden die Gene S100 calcium binding protein P und Spondin 2 ausgewählt.

### 3.2.2 MACC1 reguliert die S100P und SPON2 Expression in SW480 und SW620 Zellen

Die Zelllinien SW480 und SW620 wurden aus demselben Patienten isoliert: SW480 wurde aus dem Primärtumor und SW620 aus der Lymphknotenmetastase etabliert. Die

MACC1 Expression in den Zelllinien ist unterschiedlich. SW480 weist eine sehr geringe und SW620 eine hohe endogene MACC1 Expression auf. SW480 Zellen, die mit MACC1 transfiziert wurden, besaßen zu einer hohen MACC1 Expression auch eine hohe S100P und eine hohe SPON2 Expression im Vergleich zu SW480/Vektor Kontrollzellen ( $p < 0,01$ ,  $p = 0,02$ ; Abb. 3.13). In SW620 Zellen sind MACC1, S100P und SPON2 stark exprimiert. Wurde die MACC1 Expression in SW620 Zellen durch MACC1-shRNA reduziert, war sowohl die MACC1 Expression, als auch die S100P und die SPON2 Expression in den Zellen vermindert ( $p = 0,05$ ,  $p = 0,03$ ; Abb. 3.13).



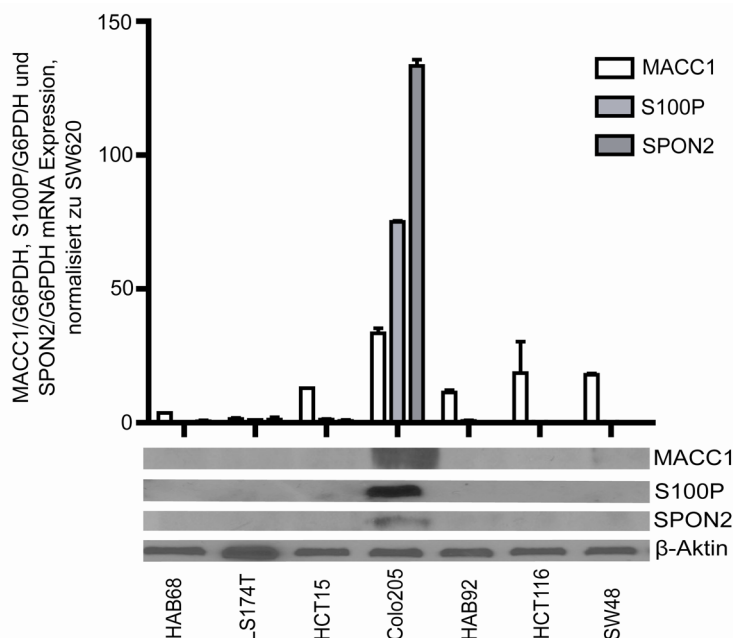
**Abb. 3.13 MACC1 regulierte die S100P und SPON2 Expression in SW480 und SW620 Zellen.**

Die Genexpression der Gene MACC1, S100P und SPON2 in den verschiedenen Zellklonen wurde mittels qRT-PCR und Western Blottings bestimmt. In MACC1 transfizierten SW480 Zellen war die MACC1 Expression als auch die S100P und die SPON2 Expression im Vergleich zu Vektor-Kontrollzellen erhöht. Hingegen zeigten SW620 Zellen mit reduzierter MACC1 Expression (MACC1-shRNA) auch eine verringerte S100P und SPON2 Expression.



### 3.2.3 Endogene S100P und SPON2 Expressionslevels in weiteren kolorektalen Karzinomzelllinien

In einem Zelllinienkollektiv von weiteren sieben kolorektalen Karzinomzelllinien wurde mittels qRT-PCR und Western Blottings die MACC1, S100P und SPON2 Expression bestimmt. Die sechs Zelllinien HAB68, LS174T, HCT15, HAB92, HCT116 und SW48 hatten eine geringe MACC1, S100P und SPON2 Expression (Abb. 3.14). Nur in der Zelllinie Colo205 waren MACC1, S100P und SPON2 stärker exprimiert. Im Vergleich zur SW620 Zelllinie zeigte sich aber in dieser Zelllinie eine niedrigere MACC1 und S100P Expression, aber eine etwas höhere SPON2 Expression.



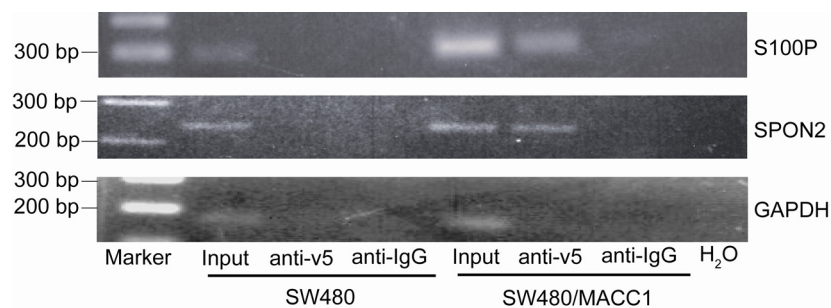
**Abb.3.14 Vergleich der MACC1, S100P und SPON2 Expression in einem Panel von sieben kolorektalen Karzinomzelllinien**

Die Expression der Gene MACC1, S100P und SPON2 wurde mittels qRT-PCR und Western Blottings bestimmt. Die Gene waren in den Zelllinien HAB68, LA174T, HCT15, HAB93, HCT116 und SW48 gar nicht oder nur schwach exprimiert. Nur in der Zelllinie Colo205 waren MACC1, S100P und SPON2 stärker exprimiert.

Folglich sind MACC1, S100P und SPON2 in diesem Zelllinienkollektiv nur in der Colo205 Zelllinie stark überexprimiert, in den anderen sechs Zelllinien hingegen kaum exprimiert sind. Da die höchste Expression der drei Gene in der SW620 Zelllinie vorliegt, wurde mit dieser Zelllinie (und mit SW480) weitergearbeitet.

### 3.2.4 MACC1 bindet an die Promoterregionen von S100P und SPON2

Für eine ChIP Analyse wurden SW480 und SW480/MACC1 Zellen verwendet. Das MACC1 Protein des SW480/MACC1 Zellklons ist an einen v5-tag gekoppelt. Mittels Anti-v5-tag Antikörper wurde der Protein/DNA-Komplex isoliert, separiert und die S100P, SPON2 und GAPDH Promoterregionen mittels PCR vervielfältigt. Die Positivkontrolle (Input) zeigte für S100P, SPON2 und GAPDH ein PCR-Produkt, die Negativkontrolle (anti-IgG) wies hingegen kein Produkt auf (Abb. 3.15). In MACC1 transfizierten Zellen konnte die S100P und SPON2, jedoch nicht die GAPDH, Promoterregion vervielfältigt werden. MACC1 band also spezifisch an die S100P (-296 bp bis + 65 bp) und SPON2 (-444 bp bis -215 bp) Promoterregionen.



**Abb. 3.15 MACC1 band an die S100P und SPON2 Promoterregionen.**

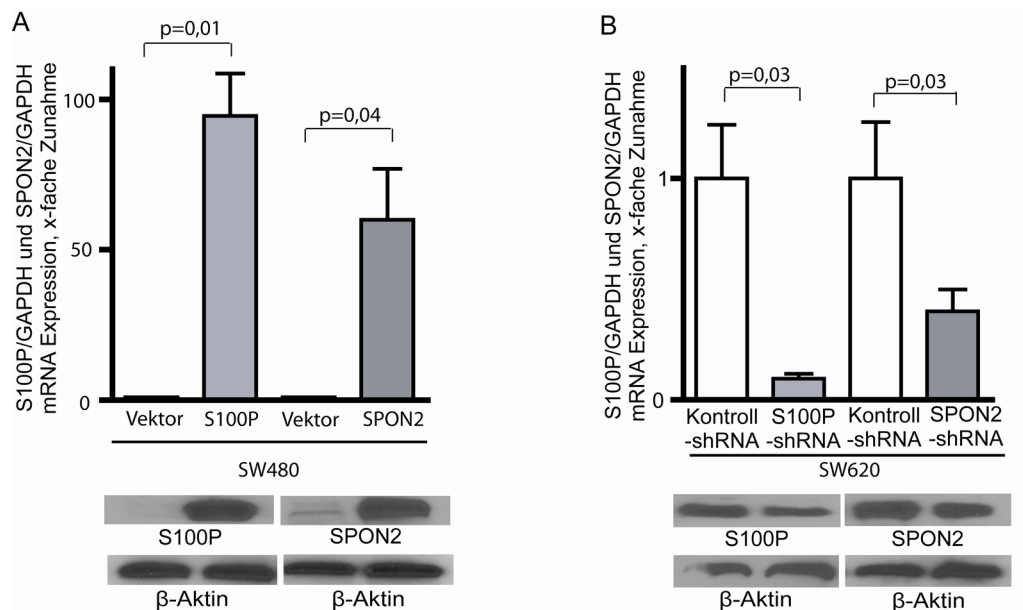
Mittels ChIP Analyse konnte gezeigt werden, dass MACC1 im SW480/MACC1 Klon in der Region -296 bp bis +65 bp im S100P Promoter und im Bereich -444 bp bis -215 bp im SPON2 Promoter gebunden hat.

### 3.2.5 Charakterisierung von S100P und SPON2 Zellklone

Für die nachfolgenden Assays wurden SW480 Zellen mit Plasmiden mit der full lengths cDNA von S100P und SPON2 und SW620 Zellen mit S100P-shRNA oder SPON2-shRNA Plasmiden transfiziert. Erfolgreich transfizierte Zellen waren Neomycin-resistent und konnten mit Hilfe von G418 selektiert werden. Anschließend wurden Klone isoliert und auf S100P und SPON2 Expression durch qRT-PCR und Western Blottings geprüft. SW480/S100P Zellklone hatten eine um ca. 90-fach erhöhte S100P-Expression im Vergleich zum Leervektor-Kontrollklon (SW480/Vektor;  $p=0,01$ ). Ebenso hatte der SW480/SPON2 Klon eine 60-fach gesteigerte SPON2 Expression ( $p=0,04$ ; Abb. 3.16 A).

Zudem wurden die Expression von S100P und SPON2 in SW620 Zellen vermindert. SW620/S100P-shRNA Klone zeigten eine um 90% reduzierte S100P Expression im Vergleich zum SW620/Kontroll-shRNA Klon ( $p=0,03$ ). Die SPON2 Expression des

SW620/SPON2-shRNA Klon war auf 40% vermindert ( $p=0,03$ ; Abb. 3.16 B).



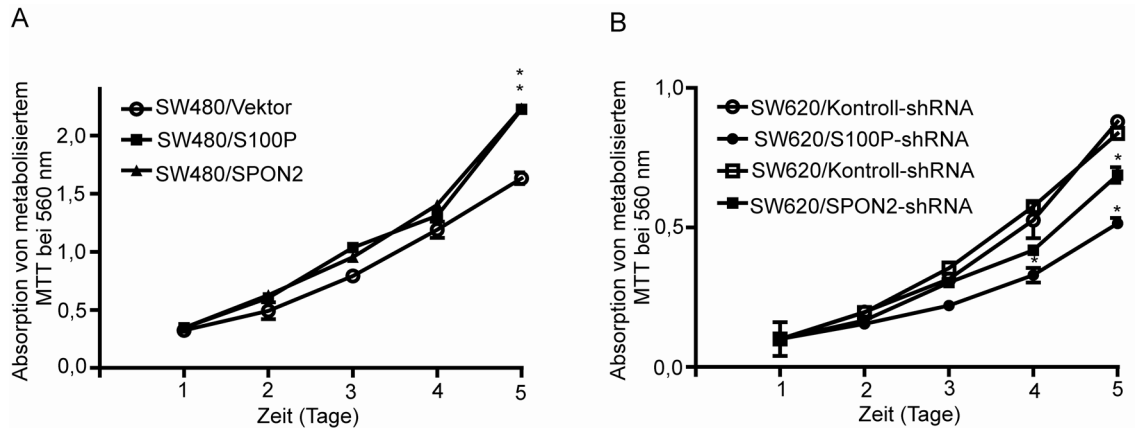
**Abb. 3.16 Zelllinien-Modelle für *in vitro* Assays.**

Die Expression der Gene S100P und SPON2 wurde mittels qRT-PCR und Western Blottings ermittelt. A) SW480/S100P Zellen zeigten eine um 90-fach erhöhte S100P Expression im Vergleich zum Kontrollklon SW480/Vektor. Auch die SPON2 Expression war im SW480/SPON2 Klon um ca. 60-fach erhöht. B) In SW620/S100P-shRNA Zellen war gegenüber dem SW620/Kontroll-shRNA Klon die S100P Expression auf 10% reduziert. Die SPON2 Expression in SW620/SPON2-shRNA Zellen wurde auf 40% vermindert.

### 3.2.6 S100P und SPON2 fördern die Zellproliferation

Die Zellproliferation der Klone SW480/Vektor, SW480/S100P und SW480/SPON2 wurde mittels MTT Assays bestimmt. Sowohl SW480/S100P als auch SW480/SPON2 Zellen zeigten eine gesteigerte Zellproliferation im Vergleich zu SW480/Vektor Kontrollzellen (Tag fünf: S100P:  $p<0,01$ , SPON2:  $p=0,02$ ; Abb. 3.17 A).

In SW620 Klonen mit verminderter S100P und SPON2 Expression war die Zellproliferationsrate geringer als in den SW620 Kontrollklonen (Tag fünf: S100P:  $p=0,04$ , SPON2:  $p=0,04$ ; Abb. 3.17 B).

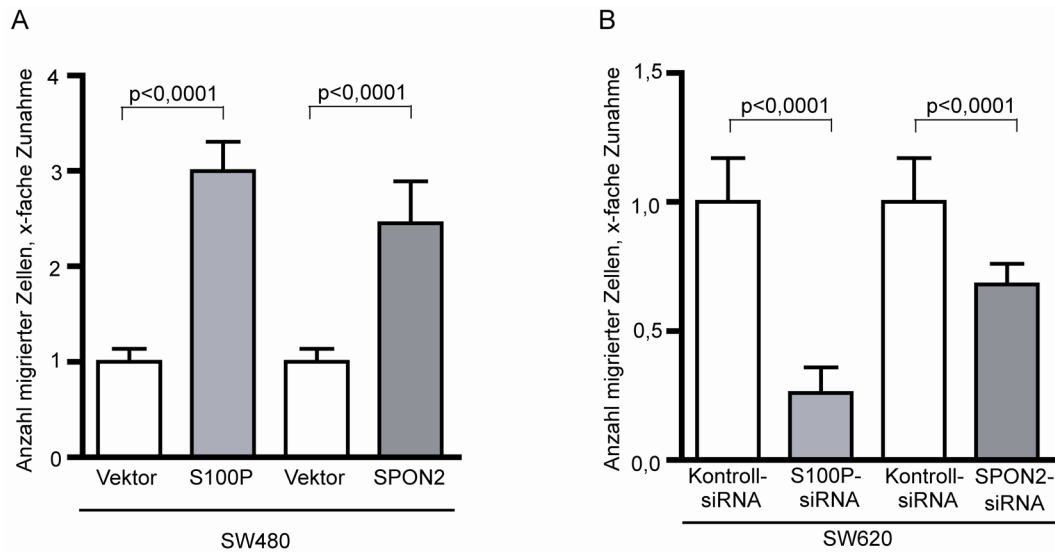


**Abb. 3.17 S100P und SPON2 förderten die Zellproliferation.**

Die Zellproliferationsassays wurden mittels MTT-Assays bis zum Tag fünf durchgeführt. A) Zellen mit einer Überexpression von S100P oder SPON2 hatten eine erhöhte Zellproliferation gegenüber SW480/Vektor Zellen (am Tag fünf: S100P:  $p < 0,01$ , SPON2:  $p = 0,02$ ). B) Eine reduzierte S100P und SPON2 Expression in SW620 Zellen verminderte auch die Zellproliferation (am Tag fünf: S100P:  $p = 0,04$ , SPON2:  $p = 0,04$ ). Da die S100P- und SPON2-shRNA Konstrukte in unterschiedliche Vektoren kloniert wurden (siehe Material und Methoden), werden hier zwei Vektorkontrollen gezeigt.

### 3.2.7 S100P und SPON2 aktivieren die Zellmigration

Das Migrationspotenzial der Zellklone wurde mit Hilfe von Boyden Chamber Assays ermittelt. Zellen mit einer S100P Überexpression hatten eine 3-fach gesteigerte Zellmigration im Vergleich zu Kontrollzellen ( $p < 0,001$ ). Ebenso zeigten Zellen mit einer hohen SPON2 Expression eine 2,5-fach erhöhte Zellmigration ( $p < 0,001$ ; Abb. 3.18 A). Des Weiteren verminderte sich die Zellmigration um 70% bei einer mittels S100P-siRNA reduzierten S100P Expression ( $p < 0,0001$ ). Ferner nahm die Zellmigration bei SPON2-siRNA behandelten Zellen im Vergleich zur siRNA Kontrolle um ca. 35% ab ( $p < 0,0001$ ; Abb. 3.18 B).



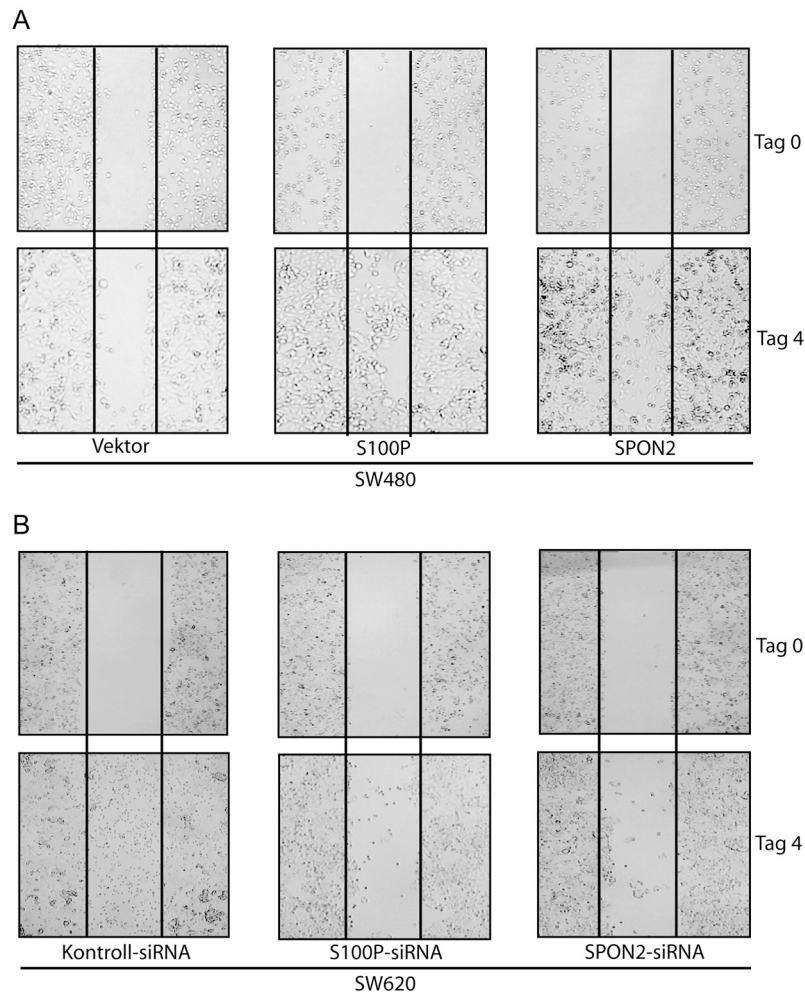
**Abb. 3.18 S100P und SPON2 erhöhten die Zellmigration.**

Das Migrationspotenzial der Zellklone wurde anhand von Boyden Chamber Assays ermittelt. A) Eine S100P oder SPON2 Überexpression in SW480 Zellen bewirkte eine um 3- bzw. 2,5-fach gesteigerte Zellmigration. B) Eine mittels S100P- bzw. SPON2-siRNA inhibierte S100P oder SPON2 Expression verminderte die Zellmigration auf 30% bzw. 65%.

### 3.2.8 S100P und SPON2 begünstigen die gerichtete Zellmigration

Mittels Wundheilungsassays wurde die gerichtete Migration von SW480 und SW620 Klonen bestimmt. SW480 Zellen mit einer erhöhten Expression von S100P oder SPON2 waren in der Lage die Wunde schneller zu schließen als Kontrollzellen SW480/Vektor. Am Tag vier zeigte sich, dass einige SW480/S100P und SW480/SPON2 Zellen bereits in die Wunde migriert waren, während die SW480/Vektor Zellen die Wunde kaum zuwuchsen (Abb. 3.19 A).

S100P- oder SPON2-siRNA behandelte SW620 Zellen hatten im Vergleich zur siRNA Kontrolle eine stark verminderte Fähigkeit zur gerichteten Zellmigration.



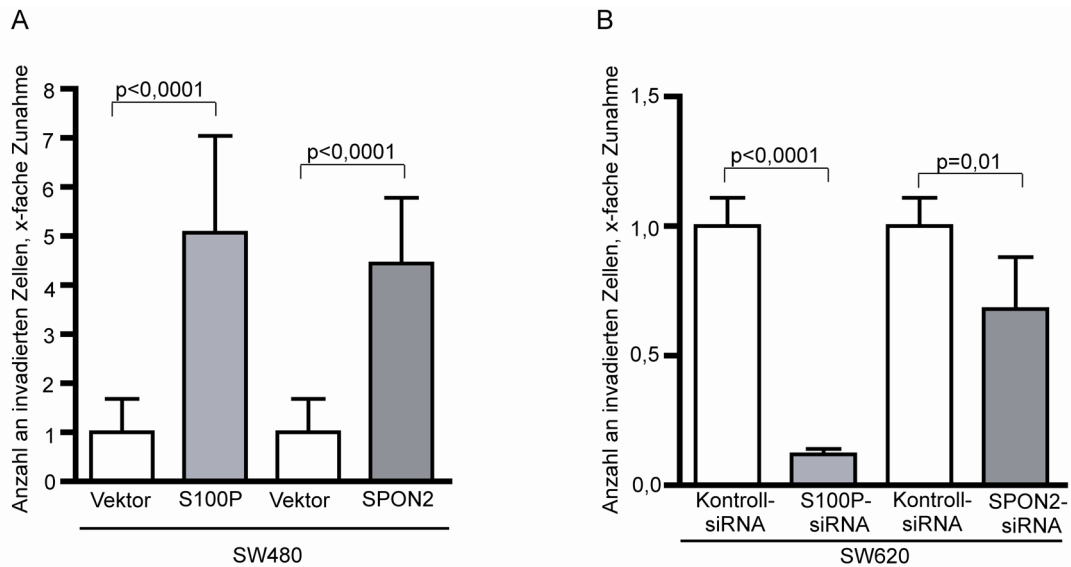
**Abb. 3.19 S100P und SPON2 förderten die gerichtete Migration.**

Der Wundheilungsassay wurde bis zum Tag vier dokumentiert. Die „Wunde“ wurde mit 10-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop fotografiert. A) Zellen mit einer hohen S100P oder SPON2 Expression schlossen die Wunde schneller als SW480/Vektor Kontrollzellen. B) Ein Knockdown der S100P oder SPON2 Expression bewirkte eine langsamere gerichtete Migration.

### 3.2.9 S100P und SPON2 steigern die Zellinvasion

Der Invasionsassay wurde mittels mit Matrigel beschichteten Boyden Chambers durchgeführt. SW480 Zellen mit einer erhöhten S100P Expression hatten ein 5-fach erhöhtes Invasionspotenzial verglichen mit SW480/Vektor Zellen ( $p < 0,0001$ , Abb. 3.20 A). Auch steigerte eine hohe SPON2 Expression die Zellinvasion um das ca. 4-fache ( $p < 0,0001$ ).

Ein Knockdown mit Hilfe von S100P-siRNA bewirkte eine auf 10% reduzierte Invasion der Zellen ( $p < 0,001$ ; Abb. 3.20 B). SPON2-siRNA behandelte SW620 Zellen zeigten eine um ca. 35% verminderte Zellinvasion im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen ( $p = 0,01$ ).



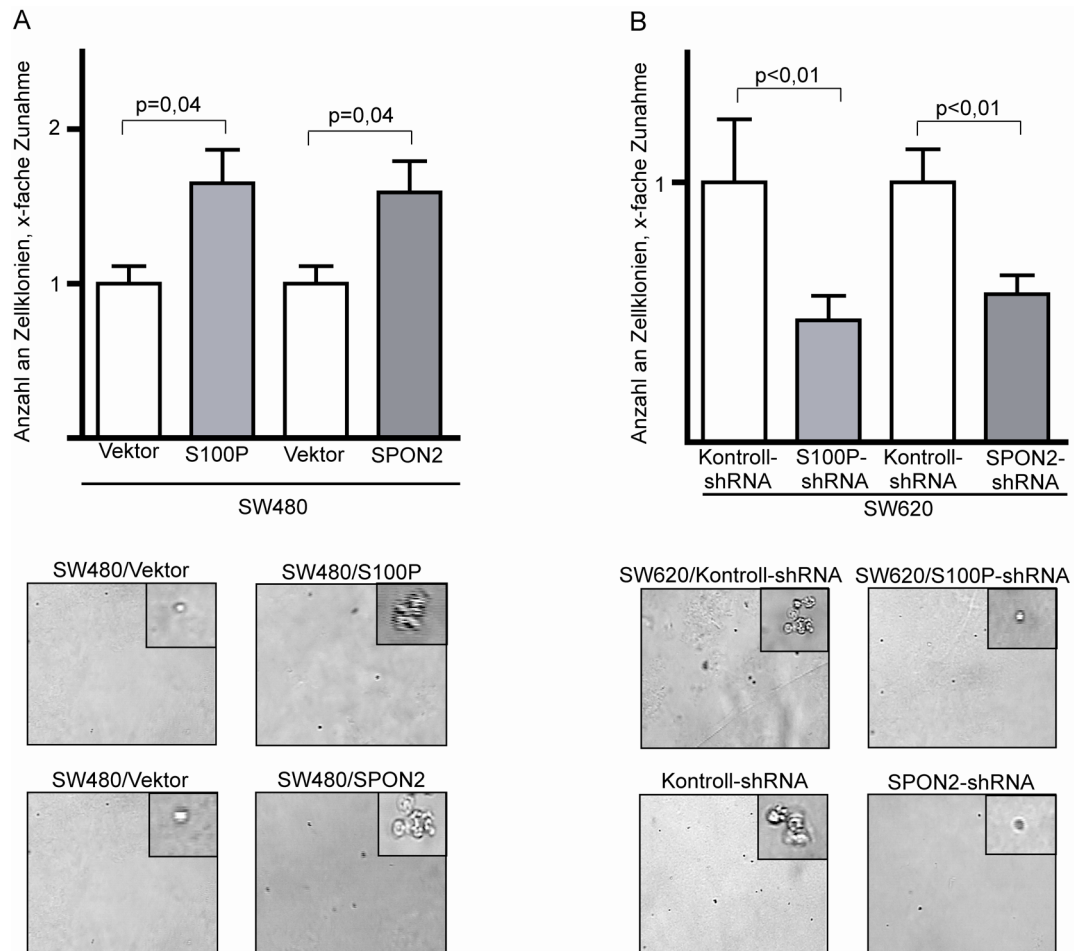
**Abb. 3.20 S100P und SPON2 förderten die Zellinvasion.**

Die Fähigkeit der Zellen zur Invasion wurde anhand von mit Matrigel beschichteten Boyden Chambers ermittelt. A) SW480 Zellen mit erhöhter S100P Expression hatten eine 5-fach erhöhte Zellmigration im Vergleich zu SW480/Vektor Zellen. SW480/SPON2 Zellen zeigten eine um das 4-fache gesteigerte Invasion. B) Die reduzierte S100P Expression in SW620 Zellen bewirkte eine auf 10% verringerte Zellinvasion. Eine Behandlung von SW620 Zellen mit SPON2-siRNA führte zu einer um 35% verminderten Zellinvasion.

### 3.2.10 S100P und SPON2 begünstigen die Koloniebildung

Einzelne Zellen der Klone wurden in Soft Agar Platten kultiviert. Nach zehn Tagen wurden die Kolonien, die aus mehr als vier Zellen bestanden, gezählt. SW480/Vektor Zellen formten im Assay kaum Zellkolonien und kamen meist als Einzelzellen vor. SW480/S100P Zellen bildeten um das 1,5-fache mehr Zellkolonien als SW480/Vektor Zellen ( $p=0,04$ ; Abb. 3.12 A). Zudem waren auch SW480/SPON2 Zellen fähig vermehrt Kolonien zu bilden ( $p=0,04$ ).

SW620 Zellen bildeten im Soft Agar weitaus häufiger Kolonien als SW480 Zellen. Die verminderte S100P Expression in SW620/S100P-shRNA Zellen führte zu einer verringerten Koloniebildungsfähigkeit ( $p<0,01$ ). Zudem bildeten SW620/SPON2-shRNA Zellen weniger Kolonien und blieben zunehmend im Einzelzellstatus ( $p<0,01$ ).



**Abb. 3.21 S100P und SPON2 steigerten die Koloniebildung.**

Die Versuche wurden mittels Koloniebildungsassay in Soft Agar Platten durchgeführt. A) Einzelne SW480/S100P und SW480/SPON2 Zellen bildeten 1,5-mal häufiger Zellkolonien als SW480/Vektor Zellen. B) Eine verminderte S100P und SPON2 Expression in SW620/S100P-shRNA und SW620/SPON2-shRNA Zellen reduzierte im Vergleich zu SW620/Kontroll-shRNA Zellen die Koloniebildungsfähigkeit auf 40-50%.

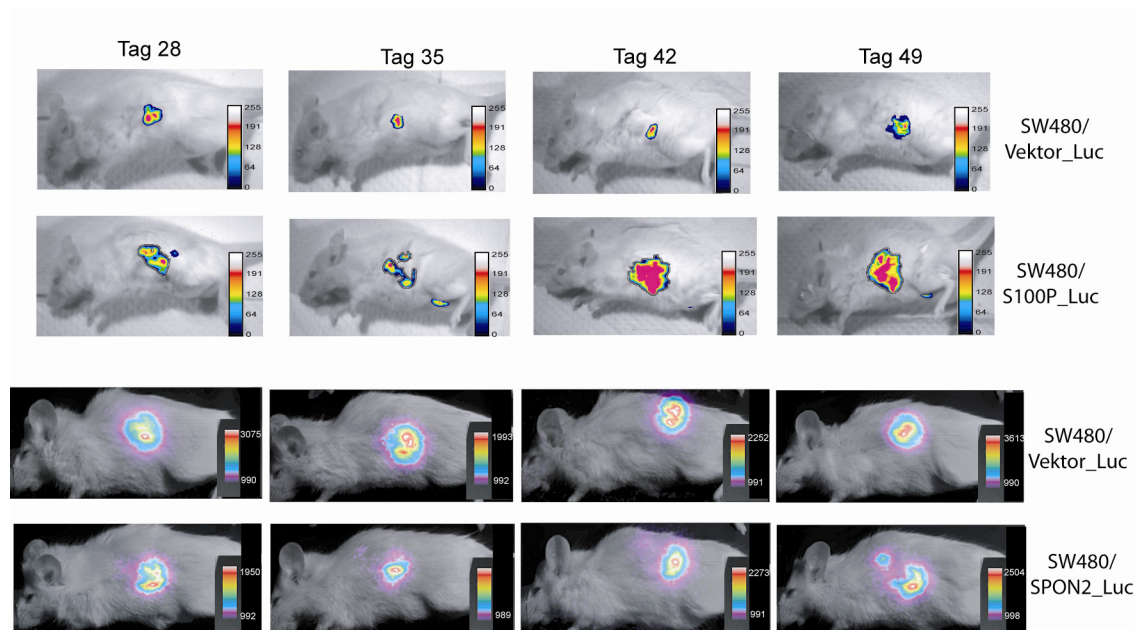
### 3.2.11 S100P und SPON2 fördern die Metastasierung *in vivo*

Nachfolgend wurde untersucht, ob eine hohe S100P oder SPON2 Expression zu einer verstärkten Tumorprogression und zur vermehrten Metastasenbildung *in vivo* führt. Hierfür wurden die Klone SW480/Vektor\_Luc, SW480/S100P\_Luc und SW480/SPON2\_Luc intrasplenal in immunsupprimierte Mäuse appliziert. Die Firefly-Luciferase in den Zellen gibt mit Hilfe von hinzugegebenen Luciferin und Sauerstoff Energie in Form von Licht ab. Wöchentlich wurde mit Hilfe des Biolumineszenz-Imagings das Tumorwachstum in der Milz und die mögliche Bildung von Metastasen beobachtet (Abb. 3.22). Zunächst wurde ein Vorversuch durchgeführt, der später in Kooperation mit Dr. Iduna Fichtner (Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin und Experimental Pharmacology and Oncology GmbH) wiederholt wurde.



SW480/Vektor\_Luc Zellen in der Milz der Mäuse (n=5) gaben ab Tag 14 nach Applikation ein deutlich messbares Signal (Abb. 3.22). Die Intensität und Größe des Signals nahm im Laufe der Zeit (bis zum Tag 49) kaum zu. Diese Zellen proliferierten folglich langsamer und bildeten einen nur kleinen Milztumor. Mäuse mit SW480/S100P\_Luc Zellen (n=5) zeigten am Tag 14 ein Milzsignal, welches in den folgenden Wochen stärker wurde und sich auf mehrere Spots verteilte. Der Primärtumor in der Milz wuchs also deutlich schneller als der Primärtumor in den Kontroll-Mäusen.

SW480/SPON2\_Luc Zellen zeigten in der Milz der Mäuse (n=9) ein zu den SW480/Vektor\_Luc Zellen vergleichbar großes Signal. Dieses Signal blieb bis zum Tag 49 konstant. Der Primärtumor wuchs in beiden Gruppen demzufolge gleich schnell.

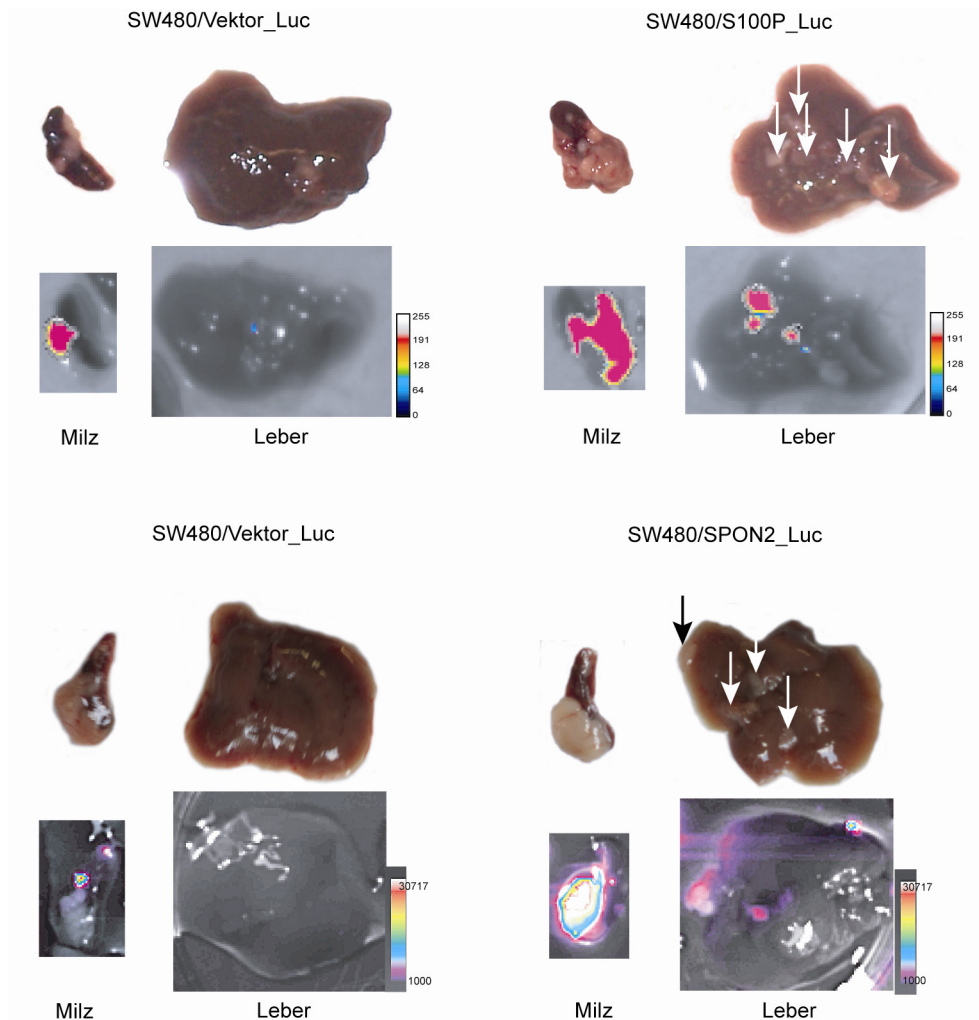


**Abb. 3.22 S100P beschleunigte das Tumorwachstum *in vivo*.**

SW480/Vektor\_Luc, SW480/S100P\_Luc Zellen und SW480/SPON2\_Luc wurden intrasplenal in Mäuse appliziert. Mittels Biolumineszenz-Messungen konnten die Zellen über einen Zeitraum von sieben Wochen lokalisiert werden. SW480/Vektor\_Luc Zellen proliferierten langsam und bildeten einen nur kleinen Milztumor. SW480/S100P\_Luc Zellen hingegen zeigten ein stärkeres und größeres Milzsignal. Es wird hier jeweils eine Maus aus der Gruppe exemplarisch dargestellt. Diese Messungen wurden mit Hilfe des Night Owl LB 981 Imagers (Berthold Technologies) mit einer Belichtungszeit von 5 min gemessen.

SW480/Vektor\_Luc Zellen in Mäusen zeigten ein zu SW480/SPON2\_Luc Zellen vergleichbar großes Milzsignal. Dieses Signal war bereits ab Tag 28 stark und nahm in den folgenden Wochen kaum zu. Es wird hier jeweils eine Maus aus der Gruppe exemplarisch dargestellt. Die Messungen wurden am VisiLuxx Imager (Visitron Systems) mit einer Belichtungszeit von 5 min durchgeführt.

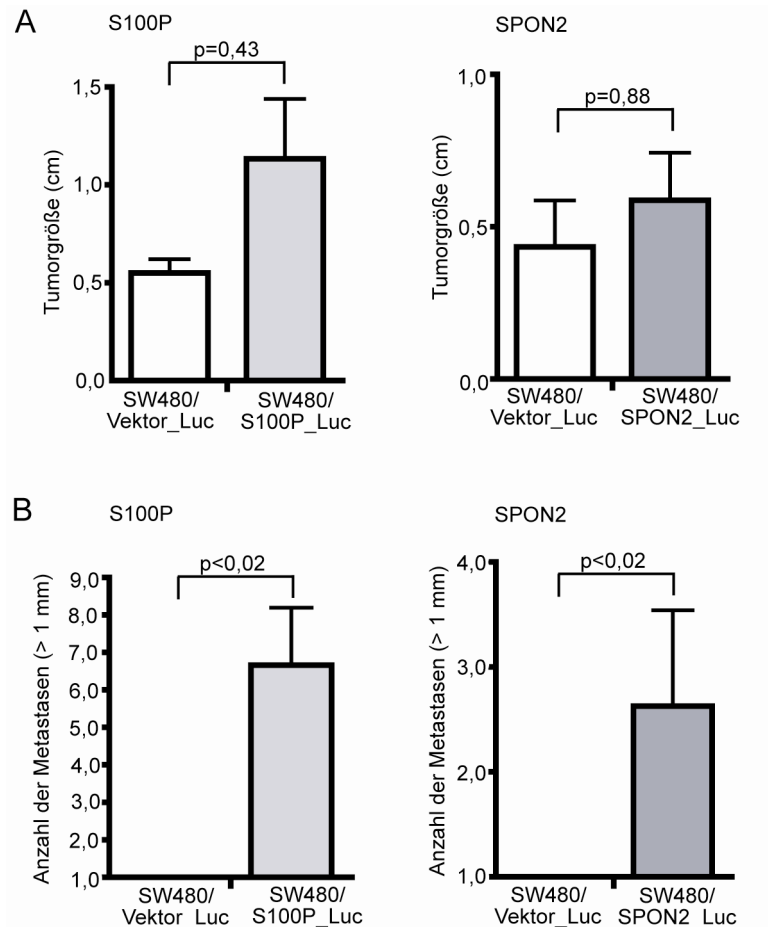
Am Tag 49 wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und geöffnet. Es wurde jeweils Milz und Leber entnommen. Durch Begutachtung der Organe konnte verifiziert werden, dass SW480/Vektor\_Luc Zellen einen moderaten Milztumor und keine Lebermetastasen gebildet haben (Abb. 3.23). Die Organe wurden mit Luciferin inkubiert und die Biolumineszenz wurde *ex vivo* gemessen. Auch hier zeigte sich, dass die Zellen nicht in die Leber metastasiert hatten. SW480/S100P\_Luc Zellen bildeten einen großen Milztumor. Die Leber hatte je nach Tier zwischen vier bis sieben 1 bis 2 mm große Lebermetastasen. SW480/SPON2\_Luc Zellen bildeten ebenso je nach Tier ein bis vier Lebermetastasen. Diese konnten auch durch die *ex vivo* Biolumineszenz-Messung nachgewiesen werden (Abb. 3.23).



**Abb. 3.23 S100P und SPON2 induzierten die Metastasenbildung *in vivo*.**

Die Mäuse wurden 49 Tage nach intrasplenaler Applikation der Tumorzellen präpariert, wobei die Leber und die Milz entnommen und die Organe fotografiert wurden. Anschließend wurde das Biolumineszenz-Signal der Zellen im Milztumor und in den Lebermetastasen *ex vivo* bestimmt. SW480/Vektor\_Luc Zellen bildeten einen moderaten Milztumor und keine Lebermetastasen. Dies konnte auch durch die Biolumineszenz-Messungen *ex vivo* nachgewiesen werden. SW480/S100P\_Luc Zellen erzeugten einen großen Milztumor und metastasierten in die Leber. SW480/SPON2\_Luc Zellen hatten einen zu den Kontrollzellen vergleichbar großen Milztumor gebildet. Zellen mit einer SPON2 Überexpression besaßen jedoch die Fähigkeit in die Leber zu metastasieren. Dargestellt sind die Organe jeweils einer Maus aus der Gruppe.

Folglich beschleunigte eine S100P Überexpression in SW480 Zellen das Tumorstadium *in vivo* (Abb. 3.24 A). Eine hohe SPON2 Expression hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorstadium (Abb. 3.24 A). SW480/S100P\_Luc Zellen und SW480/SPON2\_Luc Zellen bildeten im Gegensatz zu den Kontrollzellen SW480/Vektor\_Luc Lebermetastasen (Abb. 3.24 B).



**Abb. 3.24 S100P beschleunigte das Tumorstwachstum; S100P und SPON2 förderten die Metastasierung.**

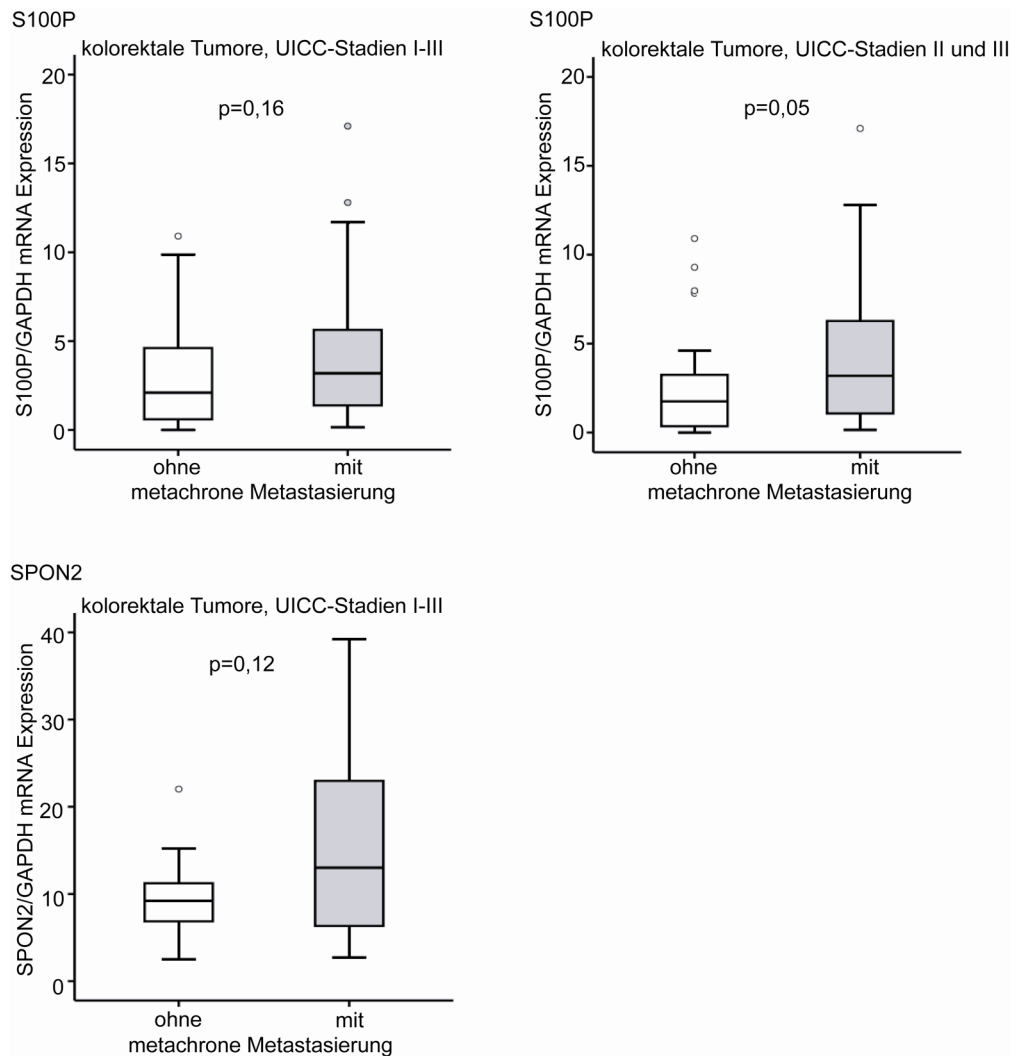
A) Mäuse mit SW480/S100P\_Luc Zellen (n=5) bildeten im Vergleich zu Mäusen mit SW480/Vektor\_Luc Zellen (n=5) einen größeren Primärtumor in der Milz. Eine SPON2 Überexpression in SW480 Zellen beeinflusste das Tumorstwachstum in den Xenograft Modellen (n=9) nicht. B) Die Kontrollzellen SW480/Vektor\_Luc metastasierten in Mäusen (n=5) nicht in die Leber. S100P überexprimierende Zellen bildeten im Durchschnitt ca. 6,5 Lebermetastasen pro Leber (n=5). Ebenso zeigten Mäuse mit SW480/SPON2\_Luc Zellen (n=9) im Durchschnitt 2,5 Lebermetastasen pro Leber.

### 3.2.12 S100P und SPON2 sind in humanen metastasierenden kolorektalen Tumoren höher exprimiert

Schließlich wurde untersucht, ob die S100P oder SPON2 Expression einen Einfluss auf die Metastasierung humaner kolorektaler Tumore hat. Hierfür wurde die S100P und SPON2 mRNA Expression in 60 primären Tumoren (UICC-Stadien I bis III) mittels qRT-PCR bestimmt. Die klinischen Daten über einen Zeitraum von fünf Jahren nach Diagnose lagen vor (siehe Anhang, Tab. 1). Die Expression der Gene S100P und SPON2 wurde in metachron metastasierenden und nicht-metastasierenden Tumoren ermittelt und verglichen (Abb. 3.24).

In Tumoren der UICC-Stadien I bis III war die S100P Expression in metachron metastasierenden Tumoren (mediane S100P Expression: 3,19 S100P mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator) im Vergleich zu nicht metachron metastasierenden Tumoren (mediane S100P Expression: 2,10 S100P mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator) leicht erhöht ( $p=0,16$ ). Analysierte man jedoch nur die Tumore in den UICC-Stadien II und III ( $n=43$ ), so hatten metachron metastasierende Tumore (mediane S100P Expression: 3,19 S100P mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator) verglichen mit nicht metachron metastasierenden Tumoren (mediane S100P Expression: 1,75 S100P mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator;  $p=0,05$ ) eine wesentlich stärkere S100P Expression ( $p=0,05$ ).

Ebenso war die SPON2 Expression in metastasierenden Tumoren (mediane SPON2 Expression: 13,92 SPON2 mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator) aller drei UICC-Stadien höher als in nicht metastasierenden Tumoren (mediane SPON2 Expression: 9,21 SPON2 mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator;  $p=0,12$ ).

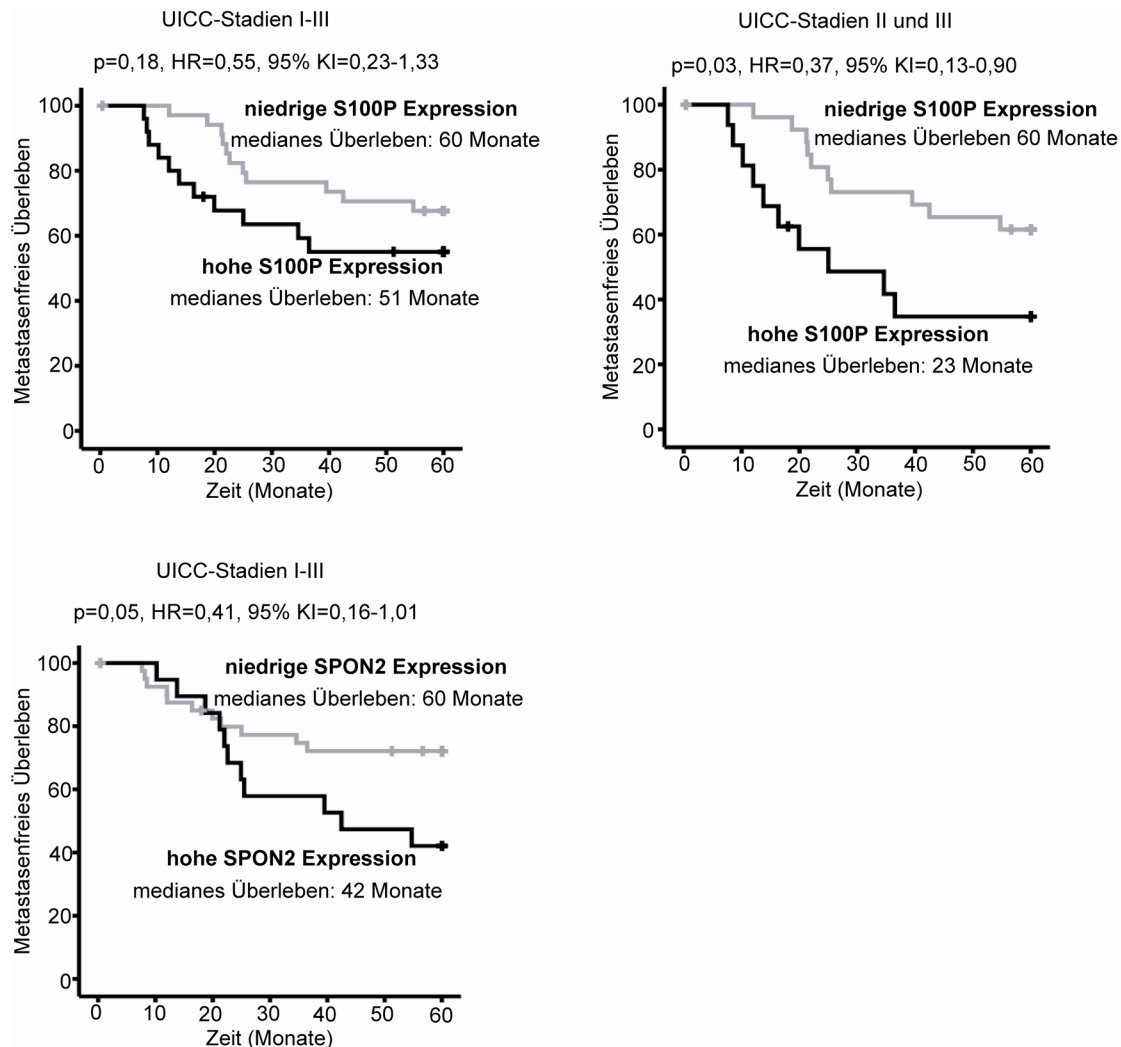


**Abb. 3.24 S100P und SPON2 waren in metachron metastasierenden Tumoren stärker exprimiert.**

S100P war in metachron metastasierenden kolorektalen Tumoren ( $n=60$ , UICC-Stadien I bis III) höher exprimiert (median Expression: 3,19 S100P mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator) als in nicht-metastasierenden (median Expression: 2,10 S100P mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator). In Tumoren im Stadium II und III ( $n=43$ ) war die S100P Expression in metastasierenden Tumoren (median Expression: 3,19 S100P mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator) wesentlich stärker als in Tumoren ohne metachrone Metastasierung (median Expression: 1,75 S100P mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator). SPON2 war in Tumoren mit metachroner Metastasierung stärker exprimiert (median Expression: 13,92 SPON2 mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator) als in Tumoren ohne Metastasierung (median Expression: 9,21 SPON2 mRNA Expression/GAPDH mRNA Expression/% Kalibrator). P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet.

### 3.2.13 Patienten mit hoher S100P oder SPON2 Expression haben ein kürzeres metastasenfreies Überleben

Es wurde ermittelt, ob die S100P oder SPON2 Genexpression in den Tumoren einen Einfluss auf das metastasenfreie Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom ( $n=60$ , UICC-Stadien I-III) hat (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25 Hohe S100P und SPON2 Expressionen waren mit einem kürzeren metastasenfreien Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom assoziiert.**

Patienten (UICC-Stadien I-III) mit einer hohen S100P Expression in den Tumoren hatten eine um 9 Monate kürzere metastasenfreie Überlebenszeit gegenüber Patienten mit niedriger S100P Expression. Patienten in UICC-Stadium II und III ( $n=43$ ) mit hoher S100P Expression besaßen eine auf 23 Monate verkürzte metastasenfreie Überlebenszeit. Zudem zeigten Patienten der Stadien I-III mit einer hohen SPON2 Expression ein geringeres metastasenfreies Überleben. Jeweils dargestellt sind die Kaplan-Meier-Kurven. Der cut-off Wert der Genexpression wurde mittels ROC Analyse ermittelt. Die p-Werte wurden mittels log-rank Test bestimmt. Die Hazard Ratios (HR) mit den dazugehörigen 95% Konfidenzintervallen (KI) sind angegeben.

Patienten mit einer hohen S100P-Expression (UICC-Stadien I-III) hatten ein kürzeres metastasenfreies Überleben im Vergleich zu Patienten mit niedriger S100P Expression ( $p=0,18$ ,  $HR=0,55$ ,  $95\% \text{ KI}=0,23-1,33$ , Abb. 3.25). Patienten im Stadium II und III ( $n=43$ ) mit einer hohen S100P Expression wiesen eine mediane metastasenfreie Überlebenszeit von nur 23 Monate im Gegensatz zu 60 Monaten für Patienten mit niedriger S100P Expression auf ( $p=0,03$ ,  $HR=0,37$ ,  $95\% \text{ KI}=0,13-0,90$ ).

Ebenso besaßen Patienten mit einer hohen SPON2 Expression eine um 18 Monate kürzere Fünf-Jahres-Überlebensrate gegenüber Patienten mit niedriger SPON2 Expression ( $p=0,05$ ,  $HR=0,41$ , 95%  $KI=0,16-1,01$ ).



## 4 DISKUSSION

Das kolorektale Karzinom ist trotz verbesserter Vorsorgeuntersuchungen immer noch die zweihäufigste Krebserkrankung in Deutschland. Die Fünf-Jahres-Überlebensraten für Patienten mit kolorektalem Karzinom sind in den letzten Jahrzehnten dank optimierter Therapiemöglichkeiten kontinuierlich gestiegen. Dennoch überleben nur ca. 10% der Patienten mit distanten Metastasen die nachfolgenden fünf Jahre nach Diagnose. Ein wichtiger Fokus der Forschung liegt also in der frühzeitigen Identifizierung und Behandlung von Patienten mit einem hohen Metastasierungsrisiko [155, 156].

Das Gen MACC1 wurde von Stein et. al als neuer Metastasierungsmarker für das kolorektale Karzinom identifiziert [84, 86]. Eine hohe MACC1 Expression in Tumoren der Stadien I bis III korreliert signifikant mit metachroner Metastasierung. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit hoher MACC1 Expression liegt bei nur 15% im Vergleich zu 80% für Patienten mit niedriger MACC1 Expression [86].

### 4.1 MACC1 Mutationsanalyse

Lang und Kollegen untersuchten die Introns von MACC1 und zeigten, dass SNP rs1990172 mit einer kürzeren Überlebenszeit für Patienten mit kolorektalem Karzinom assoziiert ist [89]. In einer Studie von Ali et al. wurde der gesamte genomische MACC1 Lokus von einer Familie mit einer angeborener Hörbehinderung sequenziert. Es wurden dabei keine Mutationen gefunden [88].

Im Zuge dieser Arbeit wurden die kodierenden MACC1 Exons in humanen kolorektalen Tumoren untersucht. Dabei wurden drei MACC1 SNPs identifiziert, die jedoch keinen funktionalen Effekt in Proliferations- und Motilitätsassays zeigten und ebenfalls nicht mit klinischen Daten assoziiert waren.

#### 4.1.1 MACC1 SNPs in humanen kolorektalen Tumoren

Im hereditären kolorektalen Karzinom treten häufig Mutationen in den DNA-Mismatch-Reparaturgenen oder im APC Gen auf [157]. Doch auch sporadisch entstehende Tumore tragen oft Mutationen, die zur Tumorentstehung und/oder Progression beitragen. Dabei haben Mutationen in einigen Genen sowohl einen prognostischen als auch einen prädiktiven Wert [158]. In 30 bis 40% der kolorektalen Tumore sind im Kodon 12 oder 13 des KRAS Gens Mutationen zu finden, die mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert sind [159]. Zugleich sind aber auch Patienten

mit mutiertem KRAS resistent gegenüber einer anti-EGFR (epidermal growth factor receptor) Behandlung mit Cetuximab und profitieren daher nicht von der Behandlung [160].

Mutationen kommen in vielen für die Krebsentstehung wichtigen Pathways vor [161]. So zeigen über 40% der kolorektalen Tumore Mutationen in Genen des MAPK Pathways [162] oder des PI3K Pathways [163] und bis zu 90% der Tumore im Wnt Pathway [164]. Zum Beispiel demonstrierten Studien, dass u. a. Mutationen in den Genen BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), PIK3CA (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide) oder PTEN (phosphatase and tensin homolog) mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden sind. Es sollte geprüft werden, ob auch MACC1 Mutationen einen Einfluss auf klinische Parameter haben.

In den 154 kolorektalen Tumoren wurden die drei SNPs rs4721888, rs975263 und rs3735615 in der kodierenden genomischen MACC1 Sequenz identifiziert. Der MACC1 SNP rs3735615 war der einzige der drei SNPs, der sowohl heterozygot als auch homozygot in den Tumoren vorkam. Alle drei SNPs waren bereits in Datenbanken annotiert. Ihr Vorkommen in kolorektalen Tumoren und ihre Assoziation mit klinischen Parametern waren bisher jedoch unbekannt.

Die drei MACC1 SNPs rs4721888, rs975263 und rs3735615 sind missense SNPs. An der Position in der DNA-Sequenz findet ein Nukleotidaustausch statt, der zu einer veränderten Aminosäuresequenz führt. Die nicht polare Aminosäure Leucin (rs4721888, L31V) ist gegen die ebenso unpolare Aminosäure Valin ausgetauscht. Der MACC1 SNP S515L (rs975263) führt zu einer Substitution von Serin zu Leucin. In diesem Fall wird die polar geladene Aminosäure Serin gegen die unpolare Aminosäure Leucin ersetzt, wobei eine mögliche Phosphorylierungsstelle verloren gehen könnte. Schließlich wird bei R804T (rs3735615) Arginin zu Threonin ausgetauscht. Dies könnte zu einer zusätzlichen Phosphorylierungsstelle im Protein führen. Außerdem liegt R804T in einem stark konservierten Bereich und in einer putativen Domäne, der zweiten Death Domäne. Deshalb sagten SIFT [152] und Polyphen Software [153] Programme einen möglichen Effekt der MACC1 Variante 804 RT oder 804 TT auf die Funktionalität des Proteins voraus. Der Einfluss von 804 RT oder TT auf das Protein sollte mittels funktionaler Assays bestimmt werden.

Wir untersuchten ausschließlich die kodierenden Exons von MACC1. Ebenso könnte man die MACC1 Promoterregion untersuchen, da eine variierte Genexpression auf Mutationen im Promoterbereich zurückzuführen sein könnte [165, 166]. Auch Methylierungsmuster in der Promoterregion könnten modifiziert sein und damit die

Genexpression verändern [167, 168]. So können methylierte Cytosine in CpG-Inseln durch Mutationen konvertiert werden und dies könnte zu einem Verlust von Methylierungsstellen im Promoterbereich führen [169].

Zudem sei auch bemerkt, dass ausschließlich die genomische DNA untersucht wurde. Da die MACC1 SNPs rs4721888 und rs975263 nur heterozygot vorkommen, ist unbekannt welche Variante exprimiert wird. Außerdem können Mutationen in der mRNA Sequenz, z. B. in der 3'UTR an der microRNAs binden, liegen [170, 171].

Die Mutationsanalyse zeigte keine Insertionen oder Deletionen im MACC1 Bereich. Ob das gesamte MACC1 Gen heterozygot deletiert oder amplifiziert ist, kann durch die Sequenzierung nicht festgestellt werden. Ein Verlust der Heterozygotie, Loss of Heterozygosity (LOH), kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. In der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms geht z. B. der Chromosomenloкус 18q21 häufig verloren [172]. Auf diesem Chromosomenarm ist u. a. das Tumorsuppressorgen DCC lokalisiert. Der Nachweis von Amplifikationen des Chromosomenarms 7p, auf dem das MACC1 Gen liegt, war nicht Gegenstand dieser Arbeit und wurde in den hier untersuchten Tumoren nicht analysiert. Diese Amplifikationen sind vor allem bei Magenkarzinomen zu finden [173]. Galimi et al. stellten fest, dass in ihrem untersuchten Kollektiv von 103 kolorektalen Tumoren fast keine Amplifikationen des MACC1 Lokus, dafür aber Polysomien des gesamten Chromosoms 7 und zudem auch eine Zunahme der Häufigkeit des Chromosomenarms 7p, zu finden waren. Durch die Chromosom 7 Polysomie und die Zunahme des 7p Arms waren in diesen Tumoren die MACC1 und MET Level erhöht [93].

#### 4.1.2 MET Varianten in humanen kolorektalen Tumoren

In zwei der 60 kolorektalen Tumoren wurden die zwei MET Varianten R988C (rs45607832) und T1010I (rs56391007) identifiziert. Wir bestätigen somit, dass MET Varianten in kolorektalen Tumoren selten vorkommen. Auch Tyner et al. beschrieben, dass MET Varianten in ihrem Panel selten zu finden waren [81]. Ob die Varianten einen Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors besitzen, wurde in vergangenen Studien kontrovers diskutiert [81-83]. Neue MET Mutationen wurden in unserem Tumorkollektiv nicht gefunden. Da in unserem zu untersuchenden Tumoren fast keine MET Varianten vorkamen, konnten wir in diesem Fall einen möglichen Einfluss von MET Varianten auf klinische Parameter, wie z. B. der metachronen Metastasierung, ausschließen.

#### 4.1.3 Einfluss von MACC1 SNPs in Motilitäts- und Proliferationsstudien

Studien gezeigt bereits, dass bestimmte SNPs in der kodierenden genomischen Sequenz bewirken, dass das Level des jeweiligen Proteins in der Zelle modifiziert wird [174, 175]. In unsere Studie hatten die MACC1 SNPs keinen Einfluss auf die MACC1 mRNA oder Protein Expression in kolorektalen Zellen oder in kolorektalen Tumoren. Die SNPs scheinen also keinen Effekt auf die Translation des Proteins zu haben.

Mit Hilfe von SIFT [152] und Polyphen Software [153] Programmen wurde ein möglicher Effekt der MACC1 Variante 804 RT oder 804 TT auf die Proteinfunktion vorausgesagt. Diesen Effekt konnten wir in Zellkulturexperimenten nicht bestätigen. Keine der MACC1 Varianten rs4721888, rs975263 und rs3735615 beeinflusste die Zellproliferation oder die MACC1-induzierte Zellmigration von SW480, DLD1 oder HCT116 Zellen. Eine Auswirkung der MACC1 SNPs auf die MACC1 Proteinstruktur, z. B. auf posttranslationale Proteinmodifikationen oder auf Bindungsfähigkeiten zu anderen Proteinen, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.1.4 Assoziation von MACC1 SNPs mit klinischen Daten und mit dem Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Die MACC1 SNPs rs4721888, rs975263 und rs3735615 waren nicht assoziiert mit Patientendaten, wie dem Geschlecht und Alter der Patienten, und auch nicht mit klinischen Daten, wie etwa dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und distanten Metastasen, der Tumordinfiltrationstiefe und den verschiedenen UICC-Stadien. Diese SNPs scheinen also keinen Einfluss auf die Metastasierung oder die Tumorprogression zu haben.

Ebenso beeinflussten die MACC1 SNPs nicht das Gesamtüberleben oder das metastasenfreie Überleben aller 154 Patienten mit kolorektalem Karzinom.

Eine Subgruppe der Patienten, jüngere Patienten mit Kolonkarzinom in frühen Stadien hatten mit MACC1 SNP 515 SL ein kürzeres metastasenfreies Überleben. Allerdings ist diese Subgruppe (n=18) sehr klein. Ein endgültiges Fazit kann nicht gezogen werden. Um eine ausreichende Aussagekraft zu haben (Power > 80%) müsste man die Variante 515 SL in einer Gruppe von mehr als 300 Patienten untersuchen [176]. Falls der SNP 515 SL aber tatsächlich die Metastasierung fördert und somit das Überleben der Patienten verkürzt, wäre das Screening für jüngere Patienten im Stadium I oder II besonders sinnvoll. Ein Fokus der Forschung liegt in der Identifizierung von prognostischen Markern, die insbesondere schon in frühen Stadien der Erkrankung eine hohe Aussagekraft besitzen. Ob die MACC1 SNPs einen prädiktiver Effekt

besitzen, d. h. ob sie die Therapiemöglichkeit der Patienten beeinflussen, bleibt zu prüfen.

Zusammenfassend ist ein Screening von kodierenden MACC1 SNPs für Patienten nicht zu empfehlen, da die bisher identifizierten SNPs keine Aussage auf die Metastasierung oder auf das Überleben der Patienten erlauben. Die Bestimmung der MACC1 Genexpression in kolorektalen Tumoren ist somit weiterhin besser geeignet um Risiko-Patienten zu identifizieren.

#### **4.2 Neu identifizierte transkriptionelle MACC1 Targetgene und deren Einfluss auf die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms**

Studien zeigten, dass MACC1 den HGF Rezeptor MET transkriptionell reguliert. MACC1 bindet an den MET Promoter und aktiviert die MET mRNA und Protein Expression [86, 91]. Im Zuge dieser Arbeit wurden mittels genomweiter Analyse die neuen transkriptionellen MACC1 Targetgene S100P und SPON2 identifiziert. Die S100P und SPON2 Expression trägt zur Tumorprogression und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms bei.

##### **4.2.1 Mittels genomweiter Analyse identifizierte MACC1 Targetgene**

Für die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren oder Targetgenen ist im Allgemeinen u. a. die ChIP-Seq (chromatin immunoprecipitation-sequencing) Methode geeignet, welche die ChIP Analyse mit einer anschließenden Sequenzierung vereint [177]. Wir entschieden uns dafür transkriptionelle Targetgene mittels Microarray-Technologie zu ermitteln. Für die Microarray Analyse wurde die genomweite Expression eines stabil überexprimierenden MACC1 Klon der Zelllinie SW480 mit einem Kontrollklon der gleichen Zelllinie verglichen. Die jeweiligen Duplikate zeigten eine gute Vergleichbarkeit. Die technische Durchführung der Microarrays war zufriedenstellend und die biologischen Replikate zeigten eine große Übereinstimmung. Eine große Anzahl an Genen war im SW480/MACC1 Klon differentiell reguliert. Von den mehr als 2-fach differentiell regulierten Genen waren 656 Gene hochreguliert und 726 Gene herunterreguliert. Das transkriptionelle Targetgen von MACC1, MET, war im SW480/MACC1 Klon 3-fach hochreguliert. In der Gruppe der hochregulierten Gene waren auch Gene aus Genfamilien zu finden, wie der KLRC (killer cell lectin-like receptor subfamily C)-Familie, der ADAMTS (ADAM metalloproteinase with

thrombospondin type 1 motif)- Familie, der FAM (family with sequence similarity)-Familie, der SEMA (sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, semaphorin)-Familie und der KIAA (protein phosphatase 1)-Familie. Die ADAMTS Metalloproteasen sind in Krebserkrankungen häufig dereguliert [178-180]. Die Semaphorine sind involviert in der Tumorentität und Angiogenese haben aber je nach untersuchter Tumorentität eine Rolle als Metastasierungsinhibitor oder als Metastasierungsinduktor [181, 182]. Einige Gene der FAM- und der KIAA-Familie sind im SW480/MACC1 Klon auch herunterreguliert. Zudem sind auch einige Gene des Histone-Clusters (histone cluster 1, H2be) herunterreguliert.

Futschik et al. verglichen die Genexpression der nicht metastasierenden SW480 Zelllinie mit der metastasierenden SW620 Zelllinie [183]. Nach Durchführung eines modifizierten Signifikanztest blieben 129 Gene übrig, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in der SW620 Zelllinie differentiell exprimiert waren. Von den 129 Genen sind 12 Gene auch in unserem SW480/MACC1 Klon differentiell reguliert. Da MACC1 in der SW480 Zelllinie kaum exprimiert ist, in der SW620 Zelllinie dagegen sehr hoch [86], könnten in dieser Zelllinie bedingt durch MACC1 Metastasierungs-induzierende Gene dereguliert sind. So sind einige der 12 Gene, die im SW480/MACC1 Klon und in der SW620 Zelllinie differentiell reguliert sind, mit Metastasierung assoziiert. Zum Beispiel fördert das in SW620 Zellen und im MACC1-Klon überexprimierte Gen TFF3 (trefoil factor 3 (intestinal)) die Zellmigration von kolorektalen Karzinomzellen [184]. Außerdem führt eine Stimulierung der Zellen mit TFF3 zur Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und EGFR, sowie zu einer Repression der E-Cadherin Expression. Dies bewirkt eine gesteigerte Zellmigration und führt zum Verlust der Zelladhäsion [185, 186]. Die NGFR (nerve growth factor receptor) Genexpression ist in SW480/MACC1 Zellen als auch in SW620 Zellen unterdrückt. Eine hohe NGFR Expression korreliert bei Mammakarzinom-Patienten mit einem längeren krankheitsfreien Überleben [187, 188]. Weitere Studien sollten prüfen, ob diese Gene durch MACC1 reguliert werden und ob MACC1 durch Regulierung dieser Gene einen Einfluss auf den metastatischen Phänotyp von SW620 Zellen hat.

Wang et al. haben MACC1 in einer Magenkarzinomzelllinie überexprimiert und mittels Microarray Technologie Gene identifiziert, die von MACC1 reguliert werden [189]. Der durchgeführte Array zeigte, dass nur 33 Gene in den MACC1 transfizierten Zellen hochreguliert und 24 Gene herunterreguliert waren. In der Studie sind als hochregulierte Gene PAGE (P antigen family), IL-6 (interleukin 6 (interferon, beta 2)), CCL5 (chemokine (C-C motif) ligand 5), SAA1 (serum amyloid A1), SAA2 (serum amyloid A2) und MAPK4 (mitogen-activated protein kinase 4) genannt. Keines der

erwähnten Gene ist in dem von uns durchgeführten Microarray hochreguliert. Wang und Kollegen identifizierten die herunterregulierten Gene GYPC (glycophorin C (Gerbich blood group)), SPRY (sprouty homolog), LOX (lysyl oxidase), SYN3 (synapsin III), ETV1 (ets variant 1), EIF4E3 (eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3), RICTOR (RPTOR independent companion of MTOR, complex 2) und PFKFB4 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4). Auch diese Gene waren in unserer Microarray Studie nicht herunterreguliert. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Tumorzellspezifität der MACC1-induzierten Effekte sein, da wir MACC1 in einer kolorektalen Karzinomzelllinie überexprimierten und Wang und Kollegen in einer Magenkarzinomzelllinie.

Zudem verglichen wir die differentiell regulierten Gene in unsere Studie mit denen von Galimi et al., die anhand bioinformatischer Methoden ermittelt wurde [93]. Durch Stein et al. wurde gezeigt, dass MACC1 an den MET Promoter bindet. Der MET Promoter wurde daher für die bioinformatischen Untersuchung herangezogen. Es wurden nur die Gene ausgewählt, die wie der MET Promoter eine oder mehrere sp1 (Specificity Protein 1)-binding sites in der Promoterregion vorweisen. Ebenso sollte die Nukleotidsequenz der sp1-site eine große Ähnlichkeit mit der in der MET Promotersequenz haben. Zudem sollte zusätzlich, wie im Met Promoter, eine AP2 (Activating Protein 2)-site zu finden sein. Letztlich sollte auch der Abstand der sp1-site zur AP2-site zu der im MET Promoterbereich ähnlich sein. Galimi und Kollegen erstellten eine Liste mit 129 potentiell von MACC1 regulierten Genen. Von den 129 identifizierten Genen sind zehn Gene auch in unserem Microarray differentiell reguliert. Dabei sind die Gene GTF2IRD1 (GTF2I repeat domain containing 1), FZD10 (frizzled family receptor 10), ASPSCR1 (alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1), UCKL1 (uridine-cytidine kinase 1-like 1), USH1C (Usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe)), CHRAC1 (chromatin accessibility complex 1), EPS8L3 (EPS8-like 3), RAD23A (RAD23 homolog A (S. cerevisiae)) in unserem SW480/MACC1 Zellklon hochreguliert und die Gene NELF (nasal embryonic LHRH factor), PPAP2C (phosphatidic acid phosphatase type 2C) herunterreguliert. Nach Validierung dieser Gene könnten diese, zusätzlich zu MET, als transkriptionelle Targetgene von MACC1 in Frage kommen.

#### 4.2.2 Aktivierte biologische Prozesse und Pathways in MACC1 überexprimierenden kolorektalen Karzinomzellen

Mittels bioinformatischen Analysen mit Hilfe von DAVID Bioinformatics Resources 6.7 wurden die differentiell regulierten Gene im SW480/MACC1 Klon in ihre biologischen Prozesse eingeteilt. Differentiell exprimierte Gene spielen in wichtigen Prozessen für die Tumorentstehung und Progression eine Rolle, wie der Regulation der Zellproliferation, Zellmigration, Zelladhäsion und Zellmotilität. Ebenso regulieren viele differentiell regulierte Gene die Zellentwicklung, die allgemeine Entwicklung, die Differenzierung von Neuronen und die Entwicklung des Nervensystems.

Auch die Einordnung in KEGG Pathway zeigt, dass viele differentiell regulierte Gene in Pathways involviert sind, die bei der Krebsentstehung häufig dereguliert sind, wie dem MAPK Pathway [190], dem P53 Pathway [191] und dem FAK (Focal Adhesion Kinase) Pathway [192]. Es wurde bereits beschrieben, dass MACC1 den MAPK Pathway aktiviert [86]. Zudem spielen die differentiell regulierten Gene eine Rolle in Pathways, die für die neuronale Entwicklung von Bedeutung sind. Zusammenfassend ist zu erkennen, dass MACC1 und nachgeschaltete Targets einen Einfluss auf entscheidende Prozesse in der Krebsentstehung und Progression haben, als auch für die Entwicklung des Nervensystems ausschlaggebend sind.

#### 4.2.3 Regulierung von S100P und SPON2 durch MACC1 in kolorektalen Karzinomzellen

Es wurden die zwei Gene S100P und SPON2, die im SW480/MACC1 Klon stark überexprimiert waren, für weitere Studien ausgewählt.

Eine MACC1 Überexpression führte in MACC1-transfizierten SW480 Zellen zu einer verstärkten mRNA und Protein Expression von S100P und SPON2. Hingegen bewirkte der Knockdown der MACC1 Expression in SW620 Zellen eine verringerte S100P und SPON2 Expression in diesen Zellen. Ebenso zeigte der ChIP-Assay, dass MACC1 in MACC1 transfizierten SW480 Zellen an die Promoterregionen von S100P und SPON2 bindet. Allerdings ist nicht geklärt, ob MACC1 direkt an die Promoterregionen oder aber im Komplex mit anderen Proteinen bindet. Bisher deuten bioinformatische Strukturanalysen nicht drauf hin, dass MACC1 eine DNA-Bindungsdomäne haben und somit als Transkriptionsfaktor wirken könnte [85].

Gibadulinova et al. zeigten, dass der S100P Core Promoter im Bereich -236 bis +58 liegt. Im S100P Promoterbereich wurden funktionelle Bindungsstellen für STAT/CREB, SMAD und SP/KLF gefunden [109]. Da gezeigt wurde, dass MACC1 an die sp1-site



im MET Promoter bindet [92], untersuchten wir die Bindungsfähigkeit von MACC1 an die von Gibadulinova et. al identifizierte sp1-site im S100P Promoter. Es konnte jedoch mittels EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Experiment nicht gezeigt werden, dass MACC1 an diese sp1-site bindet. Der genaue Mechanismus und die Bindungsstelle im S100P-Promoter sind daher noch unbekannt. Es wurde bereits gezeigt, dass ein Glucocorticoid, Dexamethason, an die Glucocorticoid-Bindungsstellen im S100P-Promoter bindet [193]. Liao et al. demonstrierten, dass die Thyroid Hormone Receptors (TRs) an TRE (thyroid hormone response elements) Bindungsstellen im SPON2 Promoter binden [134]. Weitere Bindungsstellen, von z. B. Transkriptionsfaktoren, sind im SPON2 Core Promoter noch nicht bekannt. MACC1 bindet an den SPON2 Promoterbereich -444 bp bis -215 bp. Durch weiterführende Analysen müssten die genauen Bindungsstellen von MACC1 im S100P und SPON2 Promoter aufgeklärt werden. Mittels DNA/Pull-Down Assays und Massenspektrometrie könnte gezeigt werden, welche Proteine, zusätzlich zu MACC1, an die Promotoren binden.

#### 4.2.4 S100P als Metastasierungs-induzierendes Gen

Bereits Fuentes et al. zeigten, dass eine hohe S100P Expression in SW480 Zellen eine verstärkte Zellproliferation, Zellmigration und Zellinvasion bewirkt [130]. Dies konnten wir mit unseren Versuchen bestätigen. Ebenso konnten wir wie Jiang et al. demonstrieren, dass eine reduzierte S100P Expression in SW620 Zellen zu einer verminderten Zellproliferation und Zellmigration führt [131].

Um den Einfluss der Genexpression auf das Metastasierungspotenzial der Zellen *in vivo* zu untersuchen, sind Xenograft Modelle gut geeignet. Sowohl die intrasplenale als auch die orthotrope Applikation von humanen Tumorzellen in immunsupprimierte Mäuse erlaubt Aussagen auf die Metastasierungsfähigkeit dieser Zellen [194]. Jiang et al. injizierten kolorektale Karzinomzellen DLD-1 mit einem stabilen Knockdown der S100P Expression intrasplenal in Nude Mäuse. Sowohl die Tumorgröße als auch die Anzahl der Lebermetastasen in den Nude Mäusen waren deutlich reduziert. Ding et al. bestätigten mittels orthotopem Mausmodell, dass kolorektale Karzinomzellen mit hoher S100P Expression vor allem in die Leber metastasieren [133]. Wir injizierten SW480 Zellen mit einer Überexpression von S100P intrasplenal in Xenograft Mausmodelle und konnten zeigen, dass S100P das Tumorwachstum und die Bildung von Metastasen fördert. Das Tumorwachstum wurde in diesem Falls mittels des nicht-invasiven Biolumineszenz-Imagings beobachtet. Um die in den Zellen vorhandene

*Firefly* Luciferase zu aktivieren, wurde den Mäusen vor jeder Biolumineszenz-Messung Luciferin injiziert. Im Gegensatz zur Endpunktbestimmung kann durch das Imaging genau bestimmt werden, wie und wann sich die Tumorgröße verändert und evtl. zu welchem Zeitpunkt Metastasen entstehen [195]. In unseren Versuchen konnten wir anhand des Imagings jedoch nicht feststellen, ob Lebermetastasen gebildet wurden. Das starke und großflächige Signal des Tumors in der Milz überstrahlt das meist schwächere Signal der Lebermetastasen. Zudem liegt die Leber in der Nähe der Milz und mit den herkömmlichen Geräten kann oft nur grob ermittelt werden, wo die injizierten Zellen proliferieren. Durch Öffnen der Mäuse und der Entnahme von Milz und Leber konnten wir jedoch feststellen, dass sich Lebermetastasen gebildet hatten. S100P fördert also auch das Tumorwachstum und die Lebermetastasierung *in vivo*.

In humanen Tumoren, auch in kolorektalen Tumoren, wurde bisher gezeigt, dass S100P in Primärtumoren und Metastasen höher exprimiert ist als in Normalgeweben [121, 128, 130, 133, 196-198]. Weiterhin wurde festgestellt, dass S100P schon im frühen Stadium des Adenoms hochreguliert ist [199]. Unsere Studie zeigt zum ersten Mal, dass S100P als prognostischer Marker in Betracht gezogen werden kann, da in den Primärtumoren der Stadien II und III, die später metastasieren, S100P verstärkt exprimiert ist. Zudem wird erstmals gezeigt, dass Patienten mit einer hohen S100P Expression ein kürzeres metastasenfreies Überleben haben. In unserem Tumorkollektiv ist S100P erst in metastasierenden Tumoren der Stadien II und III, nicht im Stadium I, deutlich erhöht. Dies widerspricht der Beobachtung, dass S100P schon im Adenom erhöht ist. Eine größere Studie mit einem umfangreicheren Tumorkollektiv könnte Aufschluss geben, ab welchem Stadium S100P deutlich überexprimiert ist.

Dass S100P eine Rolle in der Metastasierung spielt, wird auch ersichtlich anhand der transkriptionellen Regulierung und der Interaktionspartner von S100P. Generell wird S100P in einigen Tumoren durch Hormone gesteuert. Die S100P Expression ist im Prostatakarzinom durch Androgene und IL-6 (interleukin 6 receptor) reguliert [200-202]. Ebenso regulieren die synthetisch hergestellten Analoga der Gestagene, die Progestine, über den Progesteronrezeptor in Mammakarzinomzellen die S100P Expression [203]. Ein wichtiger S100P Aktivator ist BMP4 (bone morphogenetic protein 4). BMP4 reguliert die Transkription von S100P, wobei der genaue Mechanismus bisher unbekannt ist [113]. BMP4 ist ein Schlüsselmolekül in der EMT. Exogenes BMP4 aktiviert in der Zelle den EMT-Marker Snail, welcher als Repressor von E-Cadherin wirkt. Zudem induziert BMP4 die Aktivität der Rho-GTPasen Rac (ras-related C3 botulinum toxin substrate, rho family, small GTP binding protein Rac), RHOA (ras homolog gene family, member A) und Cdc42 (cell division cycle 42, GTP binding

protein, 25kDa) [204]. S100P trägt somit über die Aktivierung von BMP4 und den Rho-GTPasen und ihren Effektorproteinen zum metastatischen Phänotyp bei [205]. Der Interaktionspartner von S100P, IQGAP1, bindet viele weitere Proteine, wie Calmodulin, Aktin, E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, APC, Komponenten des MAPK-Pathways und Cdc42 und Rac1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)) [206-209]. Vor allem die IQGAP1-Interaktion mit den Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 fördert die Zellmotilität [210]. Außerdem interagiert S100P mit EZR, welches als Modulator zwischen dem Cytoplasma und dem Aktin-Zytoskelett vermittelt und als Metastasierung-induzierendes Protein bekannt ist [211]. Zudem hat auch der S100P-Interaktionspartner SGT1 einen Einfluss auf die Tumorprogression. Eine hohe SGT1 Expression verkürzt das Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom [212]. Weiterhin fördert die Stimulierung des Rezeptors RAGE mit dem Liganden S100P sowohl die Proliferation und das Überleben [120], als auch die Migration von Zellen [130]. Exogenes S100P führt in SW480 Zellen zur Aktivierung von RAGE und somit zur Phosphorylierung von MAP-Kinasen und zur Aktivierung von NF $\kappa$ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) [130].

S100P und viele der Interaktionspartner tragen zur Zellproliferation und Zellmigration bei. S100P hat daher einen großen Einfluss auf die Metastasierung, nicht nur beim kolorektalen Karzinom. Inhibitoren gegen S100P oder gegen S100P-Interaktionspartner könnten die kolorektale Metastasierung verlangsamen. Kürzlich wurde gezeigt, dass ein RAGE Antagonist, der die S100P Bindungsstelle am Rezeptor blockiert, das Tumorwachstum und die Metastasierung hemmt [213]. MACC1 als neuer Aktivator von S100P könnte zusätzlich als neues Target in Frage kommen und MACC1 Inhibitoren könnten MACC1, sowie nachgeschaltete Metastasierungs-fördernde Proteine, hemmen.

#### 4.2.5 SPON2 als Metastasierungs-induzierendes Gen

Wir zeigten zum ersten Mal, dass eine SPON2 Überexpression in SW480 zu einer gesteigerten Zellproliferation, Zellmigration und Zellinvasion führt. Zudem bewirkte eine verminderte SPON2 Expression eine schwächere proliferative und migratorische Fähigkeit von SW620 Zellen. Liao et al. demonstrierten, dass eine reduzierte SPON2 Expression in einer hepatozellulären Karzinomzelllinie zu einer ca. 2,6-fach gesteigerten Zellmigration und eine SPON2 Überexpression zu einer ca. 4,7-fach verminderten Zellmigration führt [134]. Dies führt zur Annahme, dass die SPON2-induzierte Zellproliferation und Zellmigration Zelllinien- bzw. Tumortyp-spezifisch ist.

Eine unterschiedliche Regulierung in kolorektalen im Vergleich zu hepatozellulären Karzinomzelllinien ist möglich. Ein Einfluss der SPON2 Expression auf die Metastasierung von Zellen in Xenograft Modellen wurde bisher nicht gezeigt. Parry und Kollegen erzeugten einen SPON2- spezifischen radioaktiv markierten Antikörper, der das Tumorwachstum von Prostatakarzinomzellen in Mäusen verlangsamte [214]. Unsere Studie zeigte, dass SPON2 in *in vitro* Assays die Proliferation der Zellen fördert, jedoch wuchs der Primärtumor in Xenograft Modellen mit SPON2 überexprimierenden Zellen nicht signifikant schneller. Ein geringer Effekt auf das Tumorwachstum ist jedoch nicht auszuschließen. Allerdings induzierte eine hohe SPON2 Expression die Metastasierung *in vivo*. Im Vergleich zu den Kontrollzellen besaßen SW480 Zellen mit einer hohen SPON2 Expression die Fähigkeit in die Leber zu metastasieren.

Liao et al. zeigten, dass SPON2 in hepatozellulären Karzinomen hochreguliert ist. Jedoch korrelierte die SPON2 Expression nicht mit dem Staging der Tumore [134]. Viele Studien zeigten, dass SPON2 in Tumoren höher exprimiert ist als im Normalgewebe [142-146]. Zudem ist die SPON2 Proteinexpression in metastasierenden Prostatakarzinomen höher als im normalen Prostatagewebe oder in nicht-metastasierenden Prostatakarzinomen [149]. Unsere Studie zeigt, dass SPON2 in metachron metastasierenden kolorektalen Tumoren höher exprimiert war als in nicht metachron metastasierenden Tumoren. Außerdem ist eine verstärkte SPON2 Expression in kolorektalen Tumoren der Stadien I bis III mit einem verkürzten metastasenfreien Überleben der Patienten assoziiert. Wir zeigen somit zum ersten Mal, dass SPON2 die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms fördern und prognostizieren könnte.

Die Metastasierungs-induzierende Wirkung von SPON2 lässt sich durch die Rolle von SPON2 in immunologischen und neurologischen Prozessen veranschaulichen. In immunologischen Reaktionen löst SPON2 durch die Aktivierung von Integrinen die Rekrutierung von Eosinophilen aus. Diese Reaktion fördert die Adhäsion und Migration von eosinophilen Zellen [215]. Zudem migrieren in Mausmodellen Leukozyten mit fehlender SPON2 Expression nicht mehr an die Entzündungsstelle [139]. SPON2 fungiert folglich als Ligand für Integrine [139]. Die Rezeptorfamilie der Integrine fördert u. a. die Progression und Metastasierung von soliden Tumoren. Integrine steuern die Invasion von Tumorzellen, indem sie die Lokalisation von MMPs (z. B. MMP2) regulieren und den FAK-Pathway aktivieren. Zugleich kontrollieren Integrine auch die Expression von Zellzyklus-Genen (z. B. Cyclin D1) und beeinflussen daher die Zellproliferation. Einige Integrin-Antagonisten werden momentan in klinischen Studien

mit Patienten mit soliden Tumoren getestet [216].

Dendritische Zellen ohne SPON2 Expression zeigten eine reduzierte Expression der Rho GTPasen RAC1 und RAC2 [138]. Die Rho GTPasen fördern die Zellmotilität, indem sie das Aktin-Zytoskelett modulieren und die Aktinpolymerisierung sowie die Depolymerisierung regulieren [217]. Die Aktivierung der Rho GTPasen durch SPON2 könnte nicht nur in dendritischen Zellen, sondern auch in Tumorzellen von Bedeutung sein. Die SPON2 Expression scheint somit ein wichtiger Regulator für die Zelladhäsion und Migration zu sein. Weiterführende Studien müssten zeigen, durch welche molekulare Mechanismen SPON2 die Motilität von Tumorzellen reguliert.

Diese Studie belegt, dass SPON2 einen Einfluss auf die Migration von Tumorzellen hat. SPON2 könnte sowohl ein prognostischer Marker für die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms als auch ein vielversprechendes Target für therapeutische Ansätze sein.

## 5 AUSBLICK

Wir konnten durch Sequenzierung drei missense SNPs in den kodierenden MACC1 Exons von humanen kolorektalen Tumoren identifizieren. Dabei könnte die MACC1 Variante 515 SL einen Einfluss auf die metastasenfreie Überlebenszeit von Patienten mit kolorektalem Karzinom besitzen. Um diese Aussage zu validieren, müsste der SNP in ungefähr weiteren 300 kolorektalen Tumoren mit dazugehörigen Follow-up Daten überprüft werden. Dies könnte zeigen, ob der SNP einen prognostischen Wert hat. Weiterhin müsste festgestellt werden, ob die MACC1 SNPs somatische Mutationen oder Keimbahnmutationen sind. Zudem könnten man andere Tumorentitäten untersuchen, um festzustellen, ob die in dieser Studie identifizierten MACC1 SNPs für das kolorektale Karzinom spezifisch sind.

Die identifizierten Targetgene von MACC1, S100P und SPON2 fördern die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms. Die genaue Bindungsstelle von MACC1 und die mögliche Interaktion von MACC1 mit anderen Proteinen am S100P oder SPON2 Promoterbereich müsste untersucht werden. Momentan wird das *in vivo* Metastasierungspotenzial von S100P und SPON2 mit einer größeren Anzahl von NOD SCID Mäusen ermittelt. Um einen prognostischen Wert von S100P oder SPON2 feststellen zu können, sollte die Expressionsanalyse in einem größeren Tumorkollektiv durchgeführt werden. Dies könnte zeigen, ob S100P oder SPON2 eine ausreichende Sensitivität und Spezifität haben, um als prognostische Marker verwendet werden zu können. Weiterhin wäre es lohnenswert Inhibitoren gegen S100P und SPON2 zu finden, die die S100P- oder SPON2-induzierte Metastasierung des kolorektalen Karzinoms hemmen könnten.

## 6 REFERENZEN

1. **Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Auflage, 2012.**
2. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW: **Colorectal cancer.** *Lancet* 2005, **365**(9454):153-165.
3. Hisamuddin IM, Yang VW: **Genetics of colorectal cancer.** *MedGenMed* 2004, **6**(3):13.
4. Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H, Janowitz HD, Aufses AH, Jr.: **A comparison of cancer risk in Crohn's disease and ulcerative colitis.** *Cancer* 1981, **48**(12):2742-2745.
5. **Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2002, External Web Site Icon National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2004 SEER data submission, posted to the SEER Web site 2005.**
6. DeCosse JJ, Ngoi SS, Jacobson JS, Cennerazzo WJ: **Gender and colorectal cancer.** *Eur J Cancer Prev* 1993, **2**(2):105-115.
7. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB: **Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis.** *Gastroenterology* 2008, **134**(2):388-395.
8. Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A, Tjonneland A, Overvad K, Jensen MK, Boutron-Ruault MC *et al*: **Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC).** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2007, **121**(9):2065-2072.
9. Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Friedenreich C, Norat T, Tjonneland A, Halkjaer J, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC *et al*: **Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC).** *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**(13):920-931.
10. **Karl Zilles und Bernhard Tillmann, Organe des Verdauungssystems, Kapitel 10, Springer Verlag, 2010.**
11. Humphries A, Wright NA: **Colonic crypt organization and tumorigenesis.** *Nature reviews Cancer* 2008, **8**(6):415-424.
12. Leedham SJ, Thliveris AT, Halberg RB, Newton MA, Wright NA: **Gastrointestinal stem cells and cancer: bridging the molecular gap.** *Stem Cell Rev* 2005, **1**(3):233-241.
13. Shih IM, Wang TL, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Ben-Sasson S, Kinzler KW, Vogelstein B: **Top-down morphogenesis of colorectal tumors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(5):2640-2645.
14. Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulson R, Jeffery R, Goodlad RA, Mandir N, Elia G, Novelli M, Bodmer WF *et al*: **Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission.** *Cancer research* 2003, **63**(13):3819-3825.
15. Cho KR, Vogelstein B: **Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence.** *Cancer* 1992, **70**(6 Suppl):1727-1731.
16. Hamilton SR, Kern SE: **Molecular genetic alterations as potential prognostic indicators in colorectal carcinoma and molecular genetics of colorectal carcinoma.** *Cancer* 1993, **72**(3):957.
17. Cho KR, Vogelstein B: **Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence.** *J Cell Biochem Suppl* 1992, **16G**:137-141.

18. Jubb AM, Bell SM, Quirke P: **Methylation and colorectal cancer.** *The Journal of pathology* 2001, **195**(1):111-134.
19. Geiersbach KB, Samowitz WS: **Microsatellite instability and colorectal cancer.** *Arch Pathol Lab Med* 2011, **135**(10):1269-1277.
20. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: **Genetic alterations during colorectal-tumor development.** *N Engl J Med* 1988, **319**(9):525-532.
21. Polakis P, Hart M, Rubinfeld B: **Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer.** *Adv Exp Med Biol* 1999, **470**:23-32.
22. Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C, Madero R, de Castro Carpeno J, Belda-Iniesta C, Barriuso J, Moreno Garcia V, Larrauri J, Lopez R et al: **KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis.** *PloS one* 2009, **4**(12):e8199.
23. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B et al: **Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability.** *Science* 1995, **268**(5215):1336-1338.
24. Jones S, Chen WD, Parmigiani G, Diehl F, Beerenwinkel N, Antal T, Traulsen A, Nowak MA, Siegel C, Velculescu VE et al: **Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(11):4283-4288.
25. Stein U, Schlag PM: **Clinical, biological, and molecular aspects of metastasis in colorectal cancer.** *Recent Results Cancer Res* 2007, **176**:61-80.
26. **Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC cancer staging manual, 6. Auflage, Springer-Verlag, New York, 2002.**
27. Pantel K, Brakenhoff RH: **Dissecting the metastatic cascade.** *Nature reviews Cancer* 2004, **4**(6):448-456.
28. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G et al: **Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.** *N Engl J Med* 2000, **342**(8):525-533.
29. Deryugina EI, Quigley JP: **Matrix metalloproteinases and tumor metastasis.** *Cancer Metastasis Rev* 2006, **25**(1):9-34.
30. Paget S: **The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889.** *Cancer Metastasis Rev* 1989, **8**(2):98-101.
31. Greenburg G, Hay ED: **Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells.** *The Journal of cell biology* 1982, **95**(1):333-339.
32. Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(6):442-454.
33. Adams CL, Nelson WJ: **Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion.** *Current opinion in cell biology* 1998, **10**(5):572-577.
34. Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, Palka HL, Green KJ: **Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments.** *International review of cytology* 1999, **185**:237-302.
35. Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP et al: **E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**(7):569-573.
36. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F: **E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers.** *The EMBO journal* 1995, **14**(24):6107-6115.



37. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A: **The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.** *Nature cell biology* 2000, **2**(2):84-89.
38. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F: **The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion.** *Mol Cell* 2001, **7**(6):1267-1278.
39. Kang Y, Massague J: **Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis.** *Cell* 2004, **118**(3):277-279.
40. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehenbre F: **Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail.** *The EMBO journal* 2006, **25**(15):3534-3545.
41. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G: **Targeting MET in cancer: rationale and progress.** *Nature reviews Cancer* 2012, **12**(2):89-103.
42. Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM: **Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET.** *Oncogene* 1991, **6**(4):501-504.
43. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA: **Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product.** *Science* 1991, **251**(4995):802-804.
44. Naka D, Ishii T, Yoshiyama Y, Miyazawa K, Hara H, Hishida T, Kidamura N: **Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer.** *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**(28):20114-20119.
45. Gherardi E, Youles ME, Miguel RN, Blundell TL, Iamelle L, Gough J, Bandyopadhyay A, Hartmann G, Butler PJ: **Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(21):12039-12044.
46. Comoglio PM: **Structure, biosynthesis and biochemical properties of the HGF receptor in normal and malignant cells.** *EXS* 1993, **65**:131-165.
47. Kong-Beltran M, Stamos J, Wickramasinghe D: **The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation.** *Cancer cell* 2004, **6**(1):75-84.
48. Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM: **Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor).** *Oncogene* 1994, **9**(1):49-57.
49. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM: **A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family.** *Cell* 1994, **77**(2):261-271.
50. Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W: **Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis.** *Nature* 1996, **384**(6605):173-176.
51. Schaeper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M, Kempkes B, Birchmeier W: **Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses.** *The Journal of cell biology* 2000, **149**(7):1419-1432.
52. Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S, Vandenbunder B, Fafeur V: **Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway.** *Oncogene* 2002, **21**(15):2309-2319.

53. Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR: **Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(1):247-252.
54. Rodrigues GA, Park M, Schlessinger J: **Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene.** *The EMBO journal* 1997, **16**(10):2634-2645.
55. Hui AY, Meens JA, Schick C, Organ SL, Qiao H, Tremblay EA, Schaeffer E, Uniyal S, Chan BM, Elliott BE: **Src and FAK mediate cell-matrix adhesion-dependent activation of Met during transformation of breast epithelial cells.** *Journal of cellular biochemistry* 2009, **107**(6):1168-1181.
56. Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, Comoglio PM: **Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway.** *Nature* 1998, **391**(6664):285-288.
57. Seger R, Krebs EG: **The MAPK signaling cascade.** *FASEB J* 1995, **9**(9):726-735.
58. Monzon FA, Ogino S, Hammond ME, Halling KC, Bloom KJ, Nikiforova MN: **The role of KRAS mutation testing in the management of patients with metastatic colorectal cancer.** *Arch Pathol Lab Med* 2009, **133**(10):1600-1606.
59. Chang L, Karin M: **Mammalian MAP kinase signalling cascades.** *Nature* 2001, **410**(6824):37-40.
60. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W: **MAP kinase signalling pathways in cancer.** *Oncogene* 2007, **26**(22):3279-3290.
61. Woolf AS, Kolatsi-Joannou M, Hardman P, Andermarcher E, Moorby C, Fine LG, Jat PS, Noble MD, Gherardi E: **Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and the met receptor in the early development of the metanephros.** *The Journal of cell biology* 1995, **128**(1-2):171-184.
62. Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C: **Met provides essential signals for liver regeneration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(29):10608-10613.
63. Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, Wehland J, Birchmeier C, Birchmeier W: **c-Met is essential for wound healing in the skin.** *The Journal of cell biology* 2007, **177**(1):151-162.
64. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C: **Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development.** *Nature* 1995, **373**(6516):699-702.
65. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N: **Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor.** *Nature* 1995, **373**(6516):702-705.
66. Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF: **Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(11):4731-4735.
67. Jeffers M, Fiscella M, Webb CP, Anver M, Koochekpour S, Vande Woude GF: **The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(24):14417-14422.
68. Parr C, Jiang WG: **Hepatocyte growth factor activation inhibitors (HAI-1 and HAI-2) regulate HGF-induced invasion of human breast cancer cells.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006, **119**(5):1176-1183.

69. Parr C, Jiang WG: **Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its activator, inhibitors and the c-Met receptor in human cancer cells.** *International journal of oncology* 2001, **19**(4):857-863.
70. Liao D, Johnson RS: **Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer.** *Cancer Metastasis Rev* 2007, **26**(2):281-290.
71. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM: **Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene.** *Cancer cell* 2003, **3**(4):347-361.
72. Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM: **Scatter factor induces blood vessel formation in vivo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(5):1937-1941.
73. Yan D, Dong Xda E, Chen X, Wang L, Lu C, Wang J, Qu J, Tu L: **MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development.** *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(43):29596-29604.
74. Boon EM, van der Neut R, van de Wetering M, Clevers H, Pals ST: **Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer.** *Cancer research* 2002, **62**(18):5126-5128.
75. Huang FI, Chen YL, Chang CN, Yuan RH, Jeng YM: **Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion.** *Carcinogenesis* 2012, **33**(6):1142-1148.
76. Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S et al: **Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1995, **1**(2):147-154.
77. Zeng ZS, Weiser MR, Kuntz E, Chen CT, Khan SA, Forslund A, Nash GM, Gimbel M, Yamaguchi Y, Culliford AT et al: **c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases.** *Cancer Lett* 2008, **265**(2):258-269.
78. Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, Zbar B, Vande Woude GF: **Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(21):11445-11450.
79. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M et al: **Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas.** *Nat Genet* 1997, **16**(1):68-73.
80. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R: **c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition.** *Cancer Metastasis Rev* 2003, **22**(4):309-325.
81. Tyner JW, Fletcher LB, Wang EQ, Yang WF, Rutenberg-Schoenberg ML, Beadling C, Mori M, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ et al: **MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity.** *Cancer research* 2010, **70**(15):6233-6237.
82. Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M, Lubensky I, Neumann HP, Brauch H, Decker J et al: **Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas.** *Oncogene* 1999, **18**(14):2343-2350.
83. Lee JH, Han SU, Cho H, Jennings B, Gerrard B, Dean M, Schmidt L, Zbar B, Vande Woude GF: **A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer.** *Oncogene* 2000, **19**(43):4947-4953.
84. Stein U, Dahlmann M, Walther W: **MACC1 - more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene.** *Journal of molecular medicine* 2010, **88**(1):11-18.

85. Kokoszynska K, Krynski J, Rychlewski L, Wyrwicz LS: **Unexpected domain composition of MACC1 links MET signaling and apoptosis.** *Acta biochimica Polonica* 2009, **56**(2):317-323.
86. Stein U, Walther W, Arlt F, Schwabe H, Smith J, Fichtner I, Birchmeier W, Schlag PM: **MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis.** *Nature medicine* 2009, **15**(1):59-67.
87. [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=346389](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=346389).
88. Ali G, Lee K, Andrade PB, Basit S, Santos-Cortez RL, Chen L, Jelani M, Ansar M, Ahmad W, Leal SM: **Novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus DFNB90 maps to 7p22.1-p15.3.** *Human heredity* 2011, **71**(2):106-112.
89. Lang AH, Geller-Rhomberg S, Winder T, Stark N, Gasser K, Hartmann B, Kohler B, Grizelj I, Drexel H, Muendlein A: **A common variant of the MACC1 gene is significantly associated with overall survival in colorectal cancer patients.** *BMC cancer* 2012, **12**:20.
90. Boardman LA: **Overexpression of MACC1 leads to downstream activation of HGF/MET and potentiates metastasis and recurrence of colorectal cancer.** *Genome medicine* 2009, **1**(4):36.
91. Arlt F, Stein U: **Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2009, **41**(12):2356-2359.
92. Stein U, Smith J, Walther W, Arlt F: **MACC1 controls Met: what a difference an Sp1 site makes.** *Cell cycle* 2009, **8**(15):2467-2469.
93. Galimi F, Torti D, Sassi F, Isella C, Cora D, Gastaldi S, Ribero D, Muratore A, Massucco P, Siatis D et al: **Genetic and expression analysis of MET, MACC1, and HGF in metastatic colorectal cancer: response to met inhibition in patient xenografts and pathologic correlations.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011, **17**(10):3146-3156.
94. Kawamura M, Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Okugawa Y, Hiro J, Uchida K, Mohri Y, Inoue Y, Kusunoki M: **Correlation of MACC1 and MET expression in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy.** *Anticancer research* 2012, **32**(4):1527-1531.
95. Qiu J, Huang P, Liu Q, Hong J, Li B, Lu C, Wang L, Wang J, Yuan Y: **Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma.** *Journal of translational medicine* 2011, **9**:166.
96. Shirahata A, Fan W, Sakuraba K, Yokomizo K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H et al: **MACC 1 as a marker for vascular invasive hepatocellular carcinoma.** *Anticancer research* 2011, **31**(3):777-780.
97. Zhang RT, Shi HR, Huang HL, Chen ZM, Liu HN, Yuan ZF: **[Expressions of MACC1, HGF, and C-met protein in epithelial ovarian cancer and their significance].** *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 2011, **31**(9):1551-1555.
98. Zhang R, Shi H, Chen Z, Wu Q, Ren F, Huang H: **Effects of metastasis-associated in colon cancer 1 inhibition by small hairpin RNA on ovarian carcinoma OVCAR-3 cells.** *J Exp Clin Cancer Res* 2011, **30**:83.
99. Migliore C, Martin V, Leoni VP, Restivo A, Atzori L, Petrelli A, Isella C, Zorcolo L, Sarotto I, Casula G et al: **MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012, **18**(3):737-747.
100. Zhang Y, Wang Z, Chen M, Peng L, Wang X, Ma Q, Ma F, Jiang B: **MicroRNA-143 Targets MACC1 to Inhibit Cell Invasion and Migration in Colorectal cancer.** *Molecular cancer* 2012, **11**:23.

101. Pichorner A, Sack U, Kobelt D, Kelch I, Arlt F, Smith J, Walther W, Schlag PM, Stein U: **In vivo imaging of colorectal cancer growth and metastasis by targeting MACC1 with shRNA in xenografted mice.** *Clinical & experimental metastasis* 2012.
102. Shirahata A, Shinmura K, Kitamura Y, Sakuraba K, Yokomizo K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G *et al*: **MACC1 as a marker for advanced colorectal carcinoma.** *Anticancer research* 2010, **30**(7):2689-2692.
103. Qu JH, Chang XJ, Lu YY, Bai WL, Chen Y, Zhou L, Zeng Z, Wang CP, An LJ, Hao LY *et al*: **Overexpression of metastasis-associated in colon cancer 1 predicts a poor outcome of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma.** *World J Gastroenterol* 2012, **18**(23):2995-3003.
104. Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, Sakuraba K, Yokomizo K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G *et al*: **MACC 1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma.** *Anticancer research* 2010, **30**(9):3441-3444.
105. Shimokawa H, Uramoto H, Onitsuka T, Chundong G, Hanagiri T, Oyama T, Yasumoto K: **Overexpression of MACC1 mRNA in lung adenocarcinoma is associated with postoperative recurrence.** *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2011, **141**(4):895-898.
106. Becker T, Gerke V, Kube E, Weber K: **S100P, a novel Ca(2+)-binding protein from human placenta. cDNA cloning, recombinant protein expression and Ca2+ binding properties.** *Eur J Biochem* 1992, **207**(2):541-547.
107. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G: **S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature).** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **322**(4):1111-1122.
108. Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW: **Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family.** *Genomics* 1995, **25**(3):638-643.
109. Gibadulinova A, Oveckova I, Parkkila S, Pastorekova S, Pastorek J: **Key promoter elements involved in transcriptional activation of the cancer-related gene coding for S100P calcium-binding protein.** *Oncology reports* 2008, **20**(2):391-396.
110. Wang Q, Williamson M, Bott S, Brookman-Amisshah N, Freeman A, Nariculam J, Hubank MJ, Ahmed A, Masters JR: **Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer.** *Oncogene* 2007, **26**(45):6560-6565.
111. Jiang H, Hu H, Tong X, Jiang Q, Zhu H, Zhang S: **Calcium-binding protein S100P and cancer: mechanisms and clinical relevance.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2012, **138**(1):1-9.
112. Zhang H, Wang G, Ding Y, Wang Z, Barraclough R, Rudland PS, Fernig DG, Rao Z: **The crystal structure at 2A resolution of the Ca2+ -binding protein S100P.** *J Mol Biol* 2003, **325**(4):785-794.
113. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Fujibuchi W, Kanno A, Umino J, Ito H, Satoh A, Kikuta K, Kume K *et al*: **Expression of the calcium-binding protein S100P is regulated by bone morphogenetic protein in pancreatic duct epithelial cell lines.** *Cancer science* 2009, **100**(1):103-110.
114. Koltzsch M, Neumann C, König S, Gerke V: **Ca2+-dependent binding and activation of dormant ezrin by dimeric S100P.** *Molecular biology of the cell* 2003, **14**(6):2372-2384.
115. Downen SE, Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Hansen M, Eloranta JJ, Bhakta V, Brentnall TA, Luttges J, Kloppel G, Lemoine NR: **Expression of S100P and its novel binding partner S100PBPR in early pancreatic cancer.** *The American journal of pathology* 2005, **166**(1):81-92.
116. Hunter KW: **Ezrin, a key component in tumor metastasis.** *Trends Mol Med* 2004, **10**(5):201-204.

117. Heil A, Nazmi AR, Koltzsch M, Poeter M, Austermann J, Assard N, Baudier J, Kaibuchi K, Gerke V: **S100P is a novel interaction partner and regulator of IQGAP1.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(9):7227-7238.
118. Nowotny M, Spiechowicz M, Jastrzebska B, Filipek A, Kitagawa K, Kuznicki J: **Calcium-regulated interaction of Sgt1 with S100A6 (calcyclin) and other S100 proteins.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(29):26923-26928.
119. Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, Kuznicki J: **CacyBP/SIP, a calcyclin and Siah-1-interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(32):28848-28852.
120. Arumugam T, Simeone DM, Schmidt AM, Logsdon CD: **S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE).** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(7):5059-5065.
121. Wang Q, Zhang YN, Lin GL, Qiu HZ, Wu B, Wu HY, Zhao Y, Chen YJ, Lu CM: **S100P, a potential novel prognostic marker in colorectal cancer.** *Oncology reports* 2012, **28**(1):303-310.
122. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Ishida K, Umino J, Ito H, Kikuta K, Kume K, Masamune A *et al*: **Calcium-binding protein S100P is a novel diagnostic marker of cholangiocarcinoma.** *Cancer science* 2011, **102**(1):150-156.
123. Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Hayashi A, Miyasaka Y, Aishima S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M, Tsuneyoshi M: **S100P is a novel marker to identify intraductal papillary mucinous neoplasms.** *Hum Pathol* 2010, **41**(6):824-831.
124. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenson JK, Giordano TJ, Misek DE, Kuick R, Hanash S: **Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer.** *Cancer research* 2003, **63**(10):2649-2657.
125. Guerreiro Da Silva ID, Hu YF, Russo IH, Ao X, Salicioni AM, Yang X, Russo J: **S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells in vitro and early stages of breast cancer development in vivo.** *International journal of oncology* 2000, **16**(2):231-240.
126. Mousses S, Bubendorf L, Wagner U, Hostetter G, Kononen J, Cornelison R, Goldberger N, Elkahoul AG, Willi N, Koivisto P *et al*: **Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays.** *Cancer research* 2002, **62**(5):1256-1260.
127. Diederichs S, Bulk E, Steffen B, Ji P, Tickenbrock L, Lang K, Zanker KS, Metzger R, Schneider PM, Gerke V *et al*: **S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer.** *Cancer research* 2004, **64**(16):5564-5569.
128. Kita H, Hikichi Y, Hikami K, Tsuneyama K, Cui ZG, Osawa H, Ohnishi H, Mutoh H, Hoshino H, Bowlus CL *et al*: **Differential gene expression between flat adenoma and normal mucosa in the colon in a microarray analysis.** *Journal of gastroenterology* 2006, **41**(11):1053-1063.
129. Bertram J, Palfner K, Hiddemann W, Kneba M: **Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression.** *Anticancer Drugs* 1998, **9**(4):311-317.

130. Fuentes MK, Nigavekar SS, Arumugam T, Logsdon CD, Schmidt AM, Park JC, Huang EH: **RAGE activation by S100P in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways.** *Diseases of the colon and rectum* 2007, **50**(8):1230-1240.
131. Jiang L, Lai YK, Zhang J, Wang H, Lin MC, He ML, Kung HF: **Targeting S100P inhibits colon cancer growth and metastasis by Lentivirus-mediated RNA interference and proteomic analysis.** *Molecular medicine* 2011, **17**(7-8):709-716.
132. Arumugam T, Ramachandran V, Gomez SB, Schmidt AM, Logsdon CD: **S100p-Derived Rage Antagonistic Peptide (Rap) Reduces Tumor Growth and Metastasis.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012.
133. Ding Q, Chang CJ, Xie X, Xia W, Yang JY, Wang SC, Wang Y, Xia J, Chen L, Cai C *et al*: **APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis.** *The Journal of clinical investigation* 2011, **121**(11):4526-4536.
134. Liao CH, Yeh SC, Huang YH, Chen RN, Tsai MM, Chen WJ, Chi HC, Tai PJ, Liao CJ, Wu SM *et al*: **Positive regulation of spondin 2 by thyroid hormone is associated with cell migration and invasion.** *Endocrine-related cancer* 2010, **17**(1):99-111.
135. Li Y, Cao C, Jia W, Yu L, Mo M, Wang Q, Huang Y, Lim JM, Ishihara M, Wells L *et al*: **Structure of the F-spondin domain of mindin, an integrin ligand and pattern recognition molecule.** *The EMBO journal* 2009, **28**(3):286-297.
136. Yan L, Wei X, Tang QZ, Feng J, Zhang Y, Liu C, Bian ZY, Zhang LF, Chen M, Bai X *et al*: **Cardiac-specific mindin overexpression attenuates cardiac hypertrophy via blocking AKT/GSK3beta and TGF-beta1-Smad signalling.** *Cardiovasc Res* 2011, **92**(1):85-94.
137. Feinstein Y, Borrell V, Garcia C, Burstyn-Cohen T, Tzarfaty V, Frumkin A, Nose A, Okamoto H, Higashijima S, Soriano E *et al*: **F-spondin and mindin: two structurally and functionally related genes expressed in the hippocampus that promote outgrowth of embryonic hippocampal neurons.** *Development* 1999, **126**(16):3637-3648.
138. Li H, Oliver T, Jia W, He YW: **Efficient dendritic cell priming of T lymphocytes depends on the extracellular matrix protein mindin.** *The EMBO journal* 2006, **25**(17):4097-4107.
139. Jia W, Li H, He YW: **The extracellular matrix protein mindin serves as an integrin ligand and is critical for inflammatory cell recruitment.** *Blood* 2005, **106**(12):3854-3859.
140. Bourdonnay E, Morzadec C, Sparfel L, Galibert MD, Jouneau S, Martin-Chouly C, Fardel O, Vernhet L: **Global effects of inorganic arsenic on gene expression profile in human macrophages.** *Mol Immunol* 2009, **46**(4):649-656.
141. He YW, Li H, Zhang J, Hsu CL, Lin E, Zhang N, Guo J, Forbush KA, Bevan MJ: **The extracellular matrix protein mindin is a pattern-recognition molecule for microbial pathogens.** *Nat Immunol* 2004, **5**(1):88-97.
142. Manda R, Kohno T, Matsuno Y, Takenoshita S, Kuwano H, Yokota J: **Identification of genes (SPON2 and C20orf2) differentially expressed between cancerous and noncancerous lung cells by mRNA differential display.** *Genomics* 1999, **61**(1):5-14.
143. Edwards S, Campbell C, Flohr P, Shipley J, Giddings I, Te-Poele R, Dodson A, Foster C, Clark J, Jhavar S *et al*: **Expression analysis onto microarrays of randomly selected cDNA clones highlights HOXB13 as a marker of human prostate cancer.** *British journal of cancer* 2005, **92**(2):376-381.

144. Romanuik TL, Ueda T, Le N, Haile S, Yong TM, Thomson T, Vessella RL, Sadar MD: **Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts.** *The American journal of pathology* 2009, **175**(6):2264-2276.
145. Simon I, Liu Y, Krall KL, Urban N, Wolfert RL, Kim NW, McIntosh MW: **Evaluation of the novel serum markers B7-H4, Spondin 2, and DcR3 for diagnosis and early detection of ovarian cancer.** *Gynecologic oncology* 2007, **106**(1):112-118.
146. Rajkumar T, Vijayalakshmi N, Gopal G, Sabitha K, Shirley S, Raja UM, Ramakrishnan SA: **Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis.** *Cancer cell international* 2010, **10**:45.
147. Carvalho B, Sillars-Hardebol AH, Postma C, Mongera S, Droste JT, Obulkasim A, van de Wiel M, van Criekinge W, Ylstra B, Fijneman RJ *et al*: **Colorectal adenoma to carcinoma progression is accompanied by changes in gene expression associated with ageing, chromosomal instability, and fatty acid metabolism.** *Cell Oncol (Dordr)* 2012, **35**(1):53-63.
148. Anderson GL, McIntosh M, Wu L, Barnett M, Goodman G, Thorpe JD, Bergan L, Thornquist MD, Scholler N, Kim N *et al*: **Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study.** *J Natl Cancer Inst* 2010, **102**(1):26-38.
149. Qian X, Li C, Pang B, Xue M, Wang J, Zhou J: **Spondin-2 (SPON2), a More Prostate-Cancer-Specific Diagnostic Biomarker.** *PloS one* 2012, **7**(5):e37225.
150. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.** *Nature protocols* 2009, **4**(1):44-57.
151. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: **Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.** *Nucleic acids research* 2009, **37**(1):1-13.
152. Kumar P, Henikoff S, Ng PC: **Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.** *Nature protocols* 2009, **4**(7):1073-1081.
153. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: **A method and server for predicting damaging missense mutations.** *Nature methods* 2010, **7**(4):248-249.
154. Bosman FT, Stamenkovic I: **Functional structure and composition of the extracellular matrix.** *The Journal of pathology* 2003, **200**(4):423-428.
155. Segal NH, Saltz LB: **Evolving treatment of advanced colon cancer.** *Annual review of medicine* 2009, **60**:207-219.
156. Bartlett DL, Chu E: **Can metastatic colorectal cancer be cured?** *Oncology* 2012, **26**(3):266-275.
157. Power DG, Glogowski E, Lipkin SM: **Clinical genetics of hereditary colorectal cancer.** *Hematology/oncology clinics of North America* 2010, **24**(5):837-859.
158. George B, Kopetz S: **Predictive and prognostic markers in colorectal cancer.** *Current oncology reports* 2011, **13**(3):206-215.
159. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ: **The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma.** *Gut* 2005, **54**(9):1283-1286.
160. Garrett CR, Eng C: **Cetuximab in the treatment of patients with colorectal cancer.** *Expert opinion on biological therapy* 2011, **11**(7):937-949.
161. Jass JR: **Colorectal cancer: a multipathway disease.** *Critical reviews in oncogenesis* 2006, **12**(3-4):273-287.



162. Blaker H, Helmchen B, Bonisch A, Aulmann S, Penzel R, Otto HF, Rieker RJ: **Mutational activation of the RAS-RAF-MAPK and the Wnt pathway in small intestinal adenocarcinomas.** *Scandinavian journal of gastroenterology* 2004, **39**(8):748-753.
163. Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, Bardelli A, Cummins JM, DeLong L, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Willson JK *et al*: **Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway.** *Nature* 2005, **436**(7052):792.
164. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW: **APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis.** *Nature* 1992, **359**(6392):235-237.
165. Newburger PE, Skalik DG, Hopkins PJ, Eklund EA, Curnutte JT: **Mutations in the promoter region of the gene for gp91-phox in X-linked chronic granulomatous disease with decreased expression of cytochrome b558.** *The Journal of clinical investigation* 1994, **94**(3):1205-1211.
166. Li YH, Chen CH, Yeh PS, Lin HJ, Chang BI, Lin JC, Guo HR, Wu HL, Shi GY, Lai ML *et al*: **Functional mutation in the promoter region of thrombomodulin gene in relation to carotid atherosclerosis.** *Atherosclerosis* 2001, **154**(3):713-719.
167. Khare S, Verma M: **Epigenetics of colon cancer.** *Methods in molecular biology* 2012, **863**:177-185.
168. Shen L, Issa JP: **Epigenetics in colorectal cancer.** *Current opinion in gastroenterology* 2002, **18**(1):68-73.
169. Qu W, Hashimoto S, Shimada A, Nakatani Y, Ichikawa K, Saito TL, Ogoshi K, Matsushima K, Suzuki Y, Sugano S *et al*: **Genome-wide genetic variations are highly correlated with proximal DNA methylation patterns.** *Genome research* 2012, **22**(8):1419-1425.
170. He L, Hannon GJ: **MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.** *Nature reviews Genetics* 2004, **5**(7):522-531.
171. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM: **Principles of microRNA-target recognition.** *PLoS biology* 2005, **3**(3):e85.
172. Martinez-Lopez E, Abad A, Font A, Monzo M, Ojanguren I, Pifarre A, Sanchez JJ, Martin C, Rosell R: **Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer.** *Gastroenterology* 1998, **114**(6):1180-1187.
173. Yang S: **Gene amplifications at chromosome 7 of the human gastric cancer genome.** *International journal of molecular medicine* 2007, **20**(2):225-231.
174. Dasgupta S, Pal P, Mukhopadhyay ND, Fu Y, Ratovitski EA, Moon CS, Hoque MO, Fisher PB, Trink B: **A single nucleotide polymorphism in the human PIGK gene associates with low PIGK expression in colorectal cancer patients.** *International journal of oncology* 2012.
175. Zhang N, Li X, Tao K, Jiang L, Ma T, Yan S, Yuan C, Moran MS, Liang F, Haffty BG *et al*: **BCL-2 (-938C > A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility.** *BMC medical genetics* 2011, **12**:48.
176. Evans DM, Purcell S: **Power calculations in genetic studies.** *Cold Spring Harbor protocols* 2012, **2012 Jun**(6):664-674.
177. Zhu JY, Sun Y, Wang ZY: **Genome-wide identification of transcription factor-binding sites in plants using chromatin immunoprecipitation followed by microarray (ChIP-chip) or sequencing (ChIP-seq).** *Methods in molecular biology* 2012, **876**:173-188.
178. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR: **The ADAMTS metalloproteinases.** *The Biochemical journal* 2005, **386**(Pt 1):15-27.
179. Rocks N, Paulissen G, El Hour M, Quesada F, Crahay C, Gueders M, Foidart JM, Noel A, Cataldo D: **Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer.** *Biochimie* 2008, **90**(2):369-379.

180. Wagstaff L, Kelwick R, Decock J, Edwards DR: **The roles of ADAMTS metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2011, **16**:1861-1872.
181. Neufeld G, Sabag AD, Rabinovicz N, Kessler O: **Semaphorins in angiogenesis and tumor progression.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012, **2**(1):a006718.
182. Sakurai A, Doci CL, Gutkind JS: **Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer.** *Cell research* 2012, **22**(1):23-32.
183. Futschik M JA, Pattison S, Kasabov N, Sullivan M, Merrie A, Reeve A: **Gene Expression Profiling of Metastatic and Nonmetastatic Colorectal Cancer Cell Lines.** *Genome Lett* 2002, **1**:26-34.
184. Babyatsky M, Lin J, Yio X, Chen A, Zhang JY, Zheng Y, Twyman C, Bao X, Schwartz M, Thung S *et al*: **Trefoil factor-3 expression in human colon cancer liver metastasis.** *Clinical & experimental metastasis* 2009, **26**(2):143-151.
185. Liu D, el-Hariry I, Karayiannakis AJ, Wilding J, Chinery R, Kmiot W, McCrea PD, Gullick WJ, Pignatelli M: **Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1997, **77**(6):557-563.
186. Efstathiou JA, Noda M, Rowan A, Dixon C, Chinery R, Jawhari A, Hattori T, Wright NA, Bodmer WF, Pignatelli M: **Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(6):3122-3127.
187. Aragona M, Panetta S, Silipigni AM, Romeo DL, Pastura G, Mesiti M, Cascinu S, La Torre F: **Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients.** *Cancer investigation* 2001, **19**(7):692-697.
188. Sakamoto Y, Kitajima Y, Edakuni G, Hamamoto T, Miyazaki K: **Combined evaluation of NGF and p75NGFR expression is a biomarker for predicting prognosis in human invasive ductal breast carcinoma.** *Oncology reports* 2001, **8**(5):973-980.
189. Wang N, Xie JM, Zheng DY, Zuo Q, Liao WJ: **[Establishment of BGC-823/pBaBb-puro-MACC1 gastric cancer cell line stably expressing MACC1 and its tumor-related gene expression profiles].** *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 2012, **32**(3):312-316.
190. Fang JY, Richardson BC: **The MAPK signalling pathways and colorectal cancer.** *The lancet oncology* 2005, **6**(5):322-327.
191. Ilyas M, Tomlinson IP: **Genetic pathways in colorectal cancer.** *Histopathology* 1996, **28**(5):389-399.
192. Golubovskaya VM, Kweh FA, Cance WG: **Focal adhesion kinase and cancer.** *Histology and histopathology* 2009, **24**(4):503-510.
193. Tothova V, Isola J, Parkkila S, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S, Gibadulinova A: **Glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation of S100P gene coding for cancer-related calcium-binding protein.** *Journal of cellular biochemistry* 2011, **112**(11):3373-3384.
194. Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH: **Mouse models of colorectal cancer and liver metastases.** *Digestive surgery* 2005, **22**(1-2):16-25.
195. Koo V, Hamilton PW, Williamson K: **Non-invasive in vivo imaging in small animal research.** *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* 2006, **28**(4):127-139.

196. Chandramouli A, Mercado-Pimentel ME, Hutchinson A, Gibadulinova A, Olson ER, Dickinson S, Shanas R, Davenport J, Owens J, Bhattacharyya AK *et al*: **The induction of S100p expression by the Prostaglandin E(2) (PGE(2))/EP4 receptor signaling pathway in colon cancer cells.** *Cancer biology & therapy* 2010, **10**(10):1056-1066.
197. Parkkila S, Pan PW, Ward A, Gibadulinova A, Oveckova I, Pastorekova S, Pastorek J, Martinez AR, Helin HO, Isola J: **The calcium-binding protein S100P in normal and malignant human tissues.** *BMC clinical pathology* 2008, **8**:2.
198. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sorensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Orntoft TF: **Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid.** *Gut* 2005, **54**(3):374-384.
199. F FL, Jankova L, Dent OF, Molloy MP, Kwun SY, Clarke C, Chapuis P, Robertson G, Beale P, Clarke S *et al*: **Identification of distinctive protein expression patterns in colorectal adenoma.** *Proteomics Clinical applications* 2010, **4**(1):60-70.
200. Amler LC, Agus DB, LeDuc C, Sapinoso ML, Fox WD, Kern S, Lee D, Wang V, Leysens M, Higgins B *et al*: **Dysregulated expression of androgen-responsive and nonresponsive genes in the androgen-independent prostate cancer xenograft model CWR22-R1.** *Cancer research* 2000, **60**(21):6134-6141.
201. Averboukh L, Liang P, Kantoff PW, Pardee AB: **Regulation of S100P expression by androgen.** *The Prostate* 1996, **29**(6):350-355.
202. Hammacher A, Thompson EW, Williams ED: **Interleukin-6 is a potent inducer of S100P, which is up-regulated in androgen-refractory and metastatic prostate cancer.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005, **37**(2):442-450.
203. Bray JD, Jelinsky S, Ghatge R, Bray JA, Tunkey C, Saraf K, Jacobsen BM, Richer JK, Brown EL, Winneker RC *et al*: **Quantitative analysis of gene regulation by seven clinically relevant progestins suggests a highly similar mechanism of action through progesterone receptors in T47D breast cancer cells.** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2005, **97**(4):328-341.
204. Theriault BL, Shepherd TG, Mujoomdar ML, Nachtigal MW: **BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells.** *Carcinogenesis* 2007, **28**(6):1153-1162.
205. Sahai E, Marshall CJ: **RHO-GTPases and cancer.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(2):133-142.
206. Mataraza JM, Li Z, Jeong HW, Brown MD, Sacks DB: **Multiple proteins mediate IQGAP1-stimulated cell migration.** *Cellular signalling* 2007, **19**(9):1857-1865.
207. Briggs MW, Sacks DB: **IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation.** *EMBO reports* 2003, **4**(6):571-574.
208. Brown MD, Sacks DB: **IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP.** *Trends in cell biology* 2006, **16**(5):242-249.
209. Roy M, Li Z, Sacks DB: **IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling.** *Molecular and cellular biology* 2005, **25**(18):7940-7952.
210. Mataraza JM, Briggs MW, Li Z, Entwistle A, Ridley AJ, Sacks DB: **IQGAP1 promotes cell motility and invasion.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(42):41237-41245.
211. Curto M, McClatchey AI: **Ezrin...a metastatic detERMinant?** *Cancer cell* 2004, **5**(2):113-114.

212. Iwatsuki M, Mimori K, Sato T, Toh H, Yokobori T, Tanaka F, Ishikawa K, Baba H, Mori M: **Overexpression of SUGT1 in human colorectal cancer and its clinicopathological significance.** *International journal of oncology* 2010, **36**(3):569-575.
213. Arumugam T, Ramachandran V, Gomez SB, Schmidt AM, Logsdon CD: **S100P-Derived RAGE Antagonistic Peptide Reduces Tumor Growth and Metastasis.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012.
214. Parry R, Schneider D, Hudson D, Parkes D, Xuan JA, Newton A, Toy P, Lin R, Harkins R, Alicke B *et al*: **Identification of a novel prostate tumor target, mindin/RG-1, for antibody-based radiotherapy of prostate cancer.** *Cancer research* 2005, **65**(18):8397-8405.
215. Li Z, Garantziotis S, Jia W, Potts EN, Lalani S, Liu Z, He YW, Foster WM, Hollingsworth JW: **The extracellular matrix protein mindin regulates trafficking of murine eosinophils into the airspace.** *Journal of leukocyte biology* 2009, **85**(1):124-131.
216. Desgrosellier JS, Cheresch DA: **Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities.** *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(1):9-22.
217. Ridley AJ: **Rho GTPases and cell migration.** *Journal of cell science* 2001, **114**(Pt 15):2713-2722.

## 7 ANHANG

Tab. 1 Klinische Parameter aller verwendeten kolorektalen Tumore

Nummer	Geschlecht	Alter	Lokalisation	T	N	Metachrone Metastasierung	UICC- Stadien	cg rs4721888	Ct rs975263	Gc rs3735615	Cc rs3735615
1	m	58	Kolon	3	0		2			x	x
2	f	51	Rektum	3	1		3			x	
3	m	60	Rektum	3	0		2			x	
4	f	62	Rektum	2	1		3			x	
5	f	67	Kolon	1	2		3	x	x	x	x
6	f	77	Kolon	3	1		3			x	
7	m	62	Kolon	3	0		2	x	x	x	x
8	m	79	Kolon	3	1		3		x	x	x
9	m	64	Kolon	3	0		2			x	x
10	m	66	Kolon	3	0		2		x	x	
11	m	61	Rektum	3	0		2			x	x
12	m	62	Kolon	3	0		2		x	x	
13	m	58	Kolon	3	0		2			x	x
14	f	70	Kolon	4	2		3				
15	f	53	Kolon	3	0		2		x	x	x
16	f	71	Rektum	3	0		2				
17	f	44	Rektum	3	0		2			x	x
18	f	64	Kolon	3	0		2			x	
19	m	71	Kolon	3	1		3			x	
20	m	64	Rektum	1	0		1	x	x	x	x
21	f	73	Kolon	3	0		2			x	x
22	f	59	Kolon	2	0		1			x	
23	f	48	Rektum	3	1	x	3		x	x	
24	m	60	Kolon	3	2		3			x	x
25	f	63	Kolon	3	0		2			x	
26	f	69	Rektum	2	0		1			x	
27	m	77	Rektum	2	0	x	1			x	x
28	m	71	Kolon	3	0		2			x	
29	f	77	Rektum	3	0		2		x	x	x
30	m	53	Kolon	3	0		2	x	x	x	x
31	f	63	Kolon	3	2	x	3		x	x	x
32	m	45	Kolon	3	0		2	x	x	x	
33	f	58	Kolon	3	1		3			x	
34	f	59	Kolon	3	1		3	x	x	x	x
35	f	57	Rektum	2	1		3		x	x	
36	f	88	Kolon	4	0		2			x	x
37	m	71	Rektum	3	1		3			x	
38	m	60	Rektum	3	1		3	x	x	x	
39	m	65	Rektum	3	1		3			x	
40	f	74	Kolon	2	0		1				
41	f	64	Kolon	3	0		2		x	x	x
42	f	81	Kolon	1	0		3			x	
43	f	73	Rektum	3	0		2			x	
44	m	59	Kolon	3	0		2		x	x	
45	f	69	Rektum	4	2		3			x	
46	f	45	Kolon	3	0		2			x	
47	f	53	Kolon	3	1		3		x	x	x
48	f	65	Kolon	3	0		2			x	
49	f	80	Kolon	4	0		2		x	x	
50	m	60	Kolon	3	0		2		x	x	x
51	f	67	Kolon	3	0		2		x	x	
52	m	65	Kolon	3	2		3			x	x
53	f	58	Rektum	2	2		3			x	x
54	f	51	Rektum	3	2		3			x	x
55	m	60	Rektum	1	0		1			x	x
56	m	62	Kolon	3	0		2			x	
57	m	67	Kolon	3	1		3			x	
58	m	77	Kolon	3	0		2		x	x	x
59	m	62	Kolon	3	3		3			x	
60	m	79	Kolon	3	1		3				
61	m	64	Rektum	3	0		2		x	x	x
62	f	66	Kolon	3	0		2			x	x
63	f	61	Kolon	3	0		2			x	

64	f	62	Kolon	4	1	x	3		x	x	
65	f	58	Rektum	3	0		2	x	x	x	
66	f	70	Kolon	3	0		2		x	x	
67	f	53	Kolon	3	0		2				
68	f	71	Kolon	4	1		3	x	x	x	x
69	m	44	Kolon	3	0		2		x	x	x
70	m	64	Kolon	3	0		2	x	x	x	x
71	m	71	Kolon	3	1		3		x	x	
72	f	64	Kolon	3	0		2	x	x	x	x
73	m	73	Kolon	3	0		2		x		
74	m	59	Kolon	3	0		2				
75	m	48	Rektum	2	0		1		x	x	
76	m	60	Rektum	3	0		2			x	x
77	f	63	Kolon	3	1		3				
78	m	69	Kolon	3	0	x	2			x	
79	m	77	Rektum	3	0		2		x	x	x
80	m	71	Kolon	1	0		1		x	x	x
81	f	77	Kolon	3	1		3			x	
82	m	53	Kolon	3	0		2		x	x	
83	m	63	Kolon	3	1		3			x	x
84	f	45	Kolon	4	0		2				
85	f	58	Kolon	3	0		2		x	x	
86	f	59	Rektum	3	1		3		x	x	
87	m	57	Kolon	3	0		2		x	x	
88	f	88	Kolon	3	0		2			x	
89	f	71	Rektum	4	1		3				
90	f	60	Kolon	2	0		1			x	
91	m	65	Kolon	3	0		2		x	x	x
92	m	74	Kolon	3	0		2				
93	f	64	Kolon	3	0		2			x	
94	m	81	Rektum	3	1		3	x	x	x	x
95	f	73	Rektum	2	0		1		x	x	x
96	m	59	Rektum	2	0		1			x	x
97	m	69	Kolon	2	0	x	1			x	
98	m	45	Rektum	2	0		1		x	x	
99	m	53	Rektum	2	0		1			x	
100	m	65	Rektum	2	0		1				
101	f	80	Kolon	1	0		1		x	x	
102	m	60	Rektum	1	0		1			x	
103	f	67	Rektum	2	0		1		x	x	
104	m	65	Rektum	1	0		1				
105	m	58	Kolon	2	0		1	x	x	x	
106	m	51	Kolon	1	0		1		x	x	x
107	m	60	Rektum	2	0		1				
108	f	62	Rektum	2	0		1		x	x	
109	m	67	Kolon	1	0		1			x	
110	m	77	Rektum	2	0	x	1		x	x	
111	m	62	Kolon	2	0	x	1		x	x	x
112	m	79	Kolon	3	0		2	x	x	x	
113	m	64	Kolon	3	0		2			x	
114	f	66	Kolon	3	0		2	x	x	x	x
115	f	61	Kolon	3	0		2			x	x
116	f	62	Kolon	3	0		2		x		
117	f	58	Kolon	3	0		2				
118	f	70	Kolon	3	0		2		x	x	x
119	m	53	Kolon	4	0		2			x	x
120	f	71	Kolon	4	0		2				
121	m	44	Kolon	3	0		2			x	
122	m	64	Kolon	3	0		2			x	
123	m	71	Kolon	3	0		2			x	
124	f	64	Kolon	3	0	x	2		x	x	
125	f	73	Kolon	4	0	x	2		x	x	
126	m	59	Rektum	4	0	x	2		x	x	
127	f	48	Rektum	4	0	x	2		x	x	x
128	m	60	Rektum	3	0	x	2				
129	m	63	Kolon	3	0	x	2			x	x
130	m	69	Rektum	4	0	x	2		x	x	x
131	f	77	Rektum	4	0	x	2			x	x
132	m	71	Kolon	3	0	x	2		x	x	
133	m	77	Rektum	3	0	x	2				
134	f	53	Kolon	3	0	x	2			x	
135	m	63	Kolon	3	1		3		x	x	
136	m	45	Kolon	3	1		3		x	x	x
137	f	58	Kolon	4	3		3				

138	m	59	Kolon	3	3		3	x	x	x	x
139	f	57	Kolon	2	3		3		x	x	
140	f	88	Kolon	3	1		3	x	x	x	
141	m	71	Kolon	3	1		3	x	x	x	x
142	m	60	Kolon	1	1		3		x	x	
143	m	65	Kolon	4	1		3			x	
144	m	74	Rektum	3	1		3				
145	m	64	Rektum	2	1	x	3		x	x	x
146	f	81	Kolon	2	1	x	3	x	x	x	
147	f	73	Rektum	3	1	x	3		x	x	x
148	f	59	Kolon	3	3	x	3			x	
149	m	69	Kolon	3	1	x	3	x	x	x	
150	m	45	Kolon	3	1	x	3		x	x	
151	f	53	Kolon	2	1	x	3		x	x	
152	f	65	Kolon	3	2	x	3				
153	m	80	Rektum	4	1	x	3				
154	m	60	Kolon	3	1	x	3				

Die Tabelle zeigt alle verwendeten kolorektalen Tumoren mit dazugehörigen klinischen Parametern, wie z. B. der Tumordinfiltrationstiefe (T) und dem Lymphknotenstatus (N). Zudem ist der MACC1 Genotyp für diese Tumore angegeben (MACC1 SNPs rs4721888, rs975263 und rs3735615). Grau unterlegt sind die Tumore, die für die S100P und SPON2 Genexpressionsanalyse verwendet wurden.

**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere hiermit, dass die von mir vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Ich versichere, dass alle aus anderen Quellen übernommenen Daten und Konzepte, sowie Ergebnisse aus Kooperationsprojekten unter Angabe der Referenz gekennzeichnet sind.

Außerdem versichere ich, dass mir die aktuelle Promotionsordnung bekannt ist und ich mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad bewerbe, bzw. noch keinen entsprechenden Doktorgrad besitze. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form nicht einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 01.10.2012

---

Felicitas Schmid



**DANKSAGUNG**

Zuerst möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Peter M. Schlag und Frau Prof. Ulrike Stein bedanken, dass ich in ihrer Forschungsgruppe an der Metastasierung von Darmkrebs und über das interessante Gen MACC1 promovieren durfte. Da ich mich sehr für die translationale Forschung interessiere, waren die zu bearbeitenden Projekte immer von großer Bedeutung für mich.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Leutz, der sich freundlicherweise als Betreuer dieser Arbeit bereit erklärt hat.

Insbesondere danke ich Frau Prof. Stein für die hervorragende Betreuung und die außerordentliche Unterstützung, sowie für die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge. Ohne ihre rückhaltlose Hilfe wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Wolfgang Walther für all seine Hilfe und die Unterstützung, auch bei den Tierversuchen, bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Kollegen aus der Arbeitsgruppe für die zu jeder Zeit gute Atmosphäre im Labor, die Hilfsbereitschaft und die nützlichen Denkanstöße.

Ich möchte mich bei der AG Kemmner für die Bereitstellung der Tumor DNA und der Hilfe mit den Microarray Analysen bedanken. Weiterhin danke ich Matthew Huska und Miguel Andrade-Navarro für die bioinformatische Auswertung der Microarrays.

Ein großer Dank gilt der Experimental Pharmacology & Oncology GmbH und ihren Mitarbeitern, vor allem Maria Stecklum, Nadine Bäsler, Margit Lemm und Dr. Iduna Fichtner. Ohne ihre Hilfe bei der OP der Mäuse und beim anschließenden Biolumineszenz-Imaging wäre das Gelingen dieses Projektes nicht möglich gewesen.

Ein Dankeschön geht an Susen Burock für Bereitstellung der klinischen Daten und für die Hilfe bei der Auswertung. Zudem danke ich Markus Niederstrasser für seine Hilfe bei statistischen Fragen.

Schließlich möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und motiviert haben, bedanken.